

Die cerebrale Hexokinase
als ein möglicher Angriffspunkt
der Narkotika

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von
Ludmilla Bielicki
aus Bielsk-Podlaski (Polen)

Marburg 1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552327_0054

Die cerebrale Hexokinase
als ein möglicher Angriffspunkt
der Narkotika

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von
Ludmilla Bielicki
aus Bielsk-Podlaski (Polen)

Marburg 1977



Vom Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie der Philipps-Universität Marburg/Lahn als Dissertation angenommen am: 27. April 1977

Tag der mündlichen Prüfung: 27. April 1977

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. J. Krieglstein

Mitberichterstatter: Prof. Dr. K. J. Netter

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmakologie und Toxikologie im Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie der Philipps-Universität Marburg/Lahn auf Anregung und unter Anleitung von Professor Dr. Dr. J. Krieglstein. Für alle Hilfe und jegliche Unterstützung möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken.

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. Einleitung	9
2. Methodik	17
2.1. Material	17
2.2. Untersuchungen des cerebralen Stoffwechsels	19
2.2.1. Experimente am isoliert perfundierten Rattenhirn	19
2.2.2. Experimente an Ratten in vivo	22
2.2.3. Extraktion der physiologischen Substanzen	22
2.2.4. Enzymatische Bestimmungen	23
2.3. Untersuchung der Rattenhirnhexokinase	26
2.3.1. Untersuchung der Hexokinaseaktivität in vitro	26
2.3.2. Untersuchung der Aktivitätsverteilung der cerebralen Hexokinase in vivo	28
2.3.3. Untersuchung der Verschiebung der Hexokinaseaktivität von der mitochondriellen zur gelösten Enzymform in vitro	30
2.3.4. Bestimmung der Hexokinaseaktivität	31
2.4. Untersuchung der cerebralen Phosphofructokinase und Pyruvatkinase	31
2.4.1. Untersuchung der cerebralen Aktivitätsverteilung der Phosphofructokinase und Pyruvatkinase	31
2.4.2. Untersuchung der Aktivität der cerebralen Phosphofructokinase und Pyruvatkinase in vitro	32
2.4.3. Bestimmung der Phosphofructokinase und Pyruvatkinaseaktivität	32
2.5. Statistische Auswertung	33
3. Ergebnisse	35
3.1. Einfluß von Thiopental und 6-Aminonicotinsäureamid auf den Energiestoffwechsel im isoliert perfundierten Rattenhirn	35

	<u>Seite</u>
3. 2. Einfluß von 6-Aminonicotinsäureamid auf die Konzentration von Glutamat, γ -Aminobuttersäure und Aspartat im Rattenhirn in vivo	40
3. 3. Einfluß von Thiopental auf die Rattenhirnhexokinase	43
3. 3. 1. Einfluß von Thiopental auf die Aktivität der cerebralen Hexokinase in vitro	43
3. 3. 2. Einfluß von Thiopental auf die Aktivitätsverteilung der cerebralen Hexokinase in vivo	47
3. 3. 3. Einfluß von Thiopental auf die mitochondrielle Rattenhirnhexokinase in vitro	51
3. 3. 4. Einfluß von 6-Aminonicotinsäureamid auf die Thiopental-effekte in vivo und in vitro	51
3. 4. Einfluß von anderen Narkotika auf die Rattenhirnhexokinase	56
3. 4. 1. Einfluß von Narkotika auf die Aktivitätsverteilung der cerebralen Hexokinase in vivo	56
3. 4. 2. Einfluß von Narkotika auf die mitochondrielle Hexokinase in vitro	56
3. 4. 3. Einfluß von Barbituraten auf die mitochondrielle Hexokinase in vitro - Abhängigkeit der Effekte von der Lipophilie der Pharmaka -	60
3. 5. Korrelation der Narkotikaeffekte auf die Aktivitätsverteilung der cerebralen Hexokinase mit dem Narkosezustand	62
3. 5. 1. Versuche mit Thiopental	62
3. 5. 2. Versuche mit Halothan	62
3. 5. 3. Versuche mit Phenobarbital und Pentetrazol	67
3. 6. Einfluß von Thiopental auf die cerebrale Phosphofructokinase und Pyruvatkinase	71
3. 6. 1. Einfluß von Thiopental auf die Aktivitätsverteilung der cerebralen Phosphofructokinase und Pyruvatkinase in vivo	71
3. 6. 2. Einfluß von Thiopental auf die Aktivität der cerebralen Phosphofructokinase und Pyruvatkinase in vitro	73

	<u>Seite</u>
4. Diskussion	77
5. Zusammenfassung	93
6. Literatur	98
7. Tabellenanhang: Einzelergebnisse	109
Lebenslauf	

1. EINLEITUNG

Die Wirkungsweise von Narkotika steht schon seit langem im Interesse der pharmakologischen Forschung. Die Literatur, die es zu dem Kapitel gibt, beschäftigt sich unter anderem sehr intensiv mit der Narkotikawirkung auf den Stoffwechsel im Gehirn. Von der Vielzahl der biochemischen Effekte der Pharmaka fand der Narkotikaeinfluß auf die Gewebsatmung besondere Beachtung. Autoren, die sich vor allem auf Untersuchungen an Gewebeschnitten, Gewebehomogenaten, Mitochondrienpräparationen und isolierten Organen stützten, diskutierten eine Hemmung der Gewebsatmung durch Narkotika (QUASTEL, 1939; JALLING et al., 1955; JALLING et al., 1957; ALDRIDGE und PARKER, 1960; SCHOLZ et al., 1966) und ferner eine Beeinträchtigung des Elektronen- und Energietransportes in der Atmungskette (BRODY und BAIN, 1951; 1954; BAIN, 1952; BRODY, 1955; DESCI, 1957; HUNTER et al., 1959; ALDRIDGE, 1962; CHANCE und HOLLUNGER, 1963; CHANCE, 1965; HANSCH und ANDERSON, 1967).

Spätere Untersuchungen der Narkotikaeffekte auf den cerebralen Energiestoffwechsel zeigten jedoch, daß die Hypothese der Störung der Atmungskette durch Narkotika für in vivo Bedingungen nicht zutreffen kann.

Während eine Hemmung des Elektronenflusses oder des Energietransportes zwangsläufig zu einer Reduktion der Energiereserven wie z. B. ATP oder Creatinphosphat und einer Zunahme der Lactatkonzentration im Gehirn führen müßte, wurde unter der Narkotikaeinwirkung eher eine Anhäufung von energiereichen Substraten beobachtet. So kommt es in der Narkose zu einer Zunahme der cerebralen Creatinphosphatkonzentration (WEINER, 1961; SCHMAHL et al., 1965; GATFIELD et al., 1966; GOLDBERG et al., 1966; GRANHOLM et al., 1968; DÖRING und OLBRISCH, 1968; 1970; WILSON, 1969), der ATP-Spiegel wird leicht erhöht oder bleibt unverändert (FLEMING und LACOURT, 1965; WILLIAMS et al., 1968; DÖRING und OLBRISCH, 1968; 1970; STRANG und BACHELARD, 1973; DREWES und GILBOE, 1973). Besonders auffallend ist aber ein Anstieg des cerebralen Glucosespiegels (Tabelle 1), der oft von einer Abnahme der Lactat- und Pyruvatkonzentration im Gehirn begleitet wird (RUTISHAUSER, 1963; MAYMAN et al., 1964; NILSSON und

Tabelle 1: Einfluß von Narkotika auf die cerebrale Glucosekonzentration
- Literaturübersicht -

Pharmakon	Glucosekonzentration im Gehirn $\mu\text{Mol/g}$		Literaturstelle
	Kontrolle	Narkose	
Thiopental	$1,09 \pm 0,06^+$ (b) $1,21 \pm 0,06^+$ (b)	$1,74 \pm 0,08$ (b) $1,78 \pm 0,11$ (b)	Hein et al., 1975 Krieglstein und Stock, 1975a
Phenobarbital	$1,17 \pm 0,19$ (b) 1,25 $0,60 \pm 0,10$ (b) $1,44 \pm 0,06^+$	$2,47 \pm 0,27$ (b) 3,76 $2,10 \pm 0,20$ (b) $2,06 \pm 0,10$	Gatfield et al., 1966 Lowry, 1966 Mayman et al., 1964 Krieglstein et al., 1972a
Hexobarbital	$1,21 \pm 0,06^+$ (b)	$1,80 \pm 0,08$ (b)	Krieglstein und Stock, 1975a
Chloralhydrat	$1,23 \pm 0,08^+$ (b)	$1,89 \pm 0,02$ (b)	Krieglstein und Stock, 1973
Urethan	$1,20 \pm 0,08$ (b)	$2,32 \pm 0,11$ (b)	Stock, Diss. 1973
Ketamin	$1,20 \pm 0,03$ (b)	$2,02 \pm 0,15$ (b)	Dedrick et al., 1975
Äther	$0,60 \pm 0,10$ (b) 1,25 1,44 $1,40 \pm 0,40$ (b)	$2,90 \pm 0,20$ (b) 3,81 2,16 $2,30 \pm 0,10$ (b)	Mayman et al., 1964 Lowry, 1966 Brunner et al., 1971 Passonneau et al., 1971
Halothan	1,40 $1,66 \pm 0,04$ (b) $1,72 \pm 0,14^+$ (a) $1,20 \pm 0,32$ (b)	2,10 $3,47 \pm 0,14$ (b) $2,19 \pm 0,16$ (a) $2,71 \pm 0,20$ (b)	Brunner et al., 1971 Biebuyck und Hawkins, 1972 Drewes und Gilboe, 1973 Dedrick et al., 1975

Die Werte sind als Mittelwerte angegeben. Streuungsangaben stellen die Standardabweichung (a) bzw. den mittleren Fehler des Mittelwertes (b) dar. Die Werte ohne die Streuungsangaben wurden den graphischen Darstellungen entnommen. (+) Ergebnisse der Versuche an isoliert perfundierten Hirnen. Alle anderen Versuche wurden unter in vivo Bedingungen durchgeführt.

SJESJÖ, 1970; TABERNER et al., 1972; DUFFY et al., 1972; MacMILLAN und SJESJÖ, 1973; KRIEGLSTEIN und STOCK, 1973; 1975a). Der Glucoseanstieg spiegelt sich auch in einer erhöhten cerebralen Glykogenkonzentration wider (MAYMAN et al., 1964; NELSON et al., 1968; BRUNNER et al., 1971; PASSONNEAU et al., 1971; DREWES und GILBOE, 1973). Diese Befunde sprechen deutlich dagegen, daß in der Narkose energieliefernde Prozesse betroffen sein könnten; im Gegenteil scheinen Narkotika, durch eine Anhäufung von cerebralen Energiereserven, die Energielage des Gehirns zu verbessern.

In Anbetracht der Ergebnisse der mit Narkotika durchgeführten Untersuchungen am cerebralen Energiestoffwechsel wird von mehreren Autoren eine Hemmung der Glykolyse durch diese Pharmaka postuliert (LOWRY et al., 1964; GEY et al., 1965; SMITH und WOLLMAN, 1972; STRANG und BACHELARD, 1973; HUSAIN und PARADISE, 1973; NILSSON und SJESJÖ, 1974). Widersprüchlich und unklar sind jedoch die Vorstellungen darüber, wie es zu der Beeinträchtigung des Glucoseflusses im Embden-Meyerhof-Weg kommt. Eine mögliche Hemmung der ersten Glykolyse Schritte wird von verschiedenen Autoren diskutiert (LOWRY und PASSONNEAU, 1964; LOWRY et al., 1964; HUSAIN und PARADISE, 1973; STRANG und BACHELARD, 1973; NILSSON und SJESJÖ, 1974; KRIEGLSTEIN und STOCK, 1975a). Das Interesse gilt vor allem den beiden Schlüsselenzymen Hexokinase und Phosphofructokinase, die über die Phosphorylierungsgeschwindigkeit der Glucose den glykolytischen Fluß dem Energiebedarf der Zelle anpassen. LOWRY und PASSONNEAU (1964), GATFIELD et al. (1966), NELSON et al. (1968) und NILSSON und SJESJÖ (1974), die nach Narkotika, neben den schon erwähnten Veränderungen im Energiestoffwechsel, eine Zunahme der cerebralen Konzentration von Glucose-6-phosphat fanden, sprechen von einer möglichen Hemmung der Phosphofructokinase als der Ursache der verlangsamten Glykolyse. Andere Autoren konnten aber zeigen, daß bei einer erhöhten Glucosekonzentration unter der Einwirkung von Narkotika der Spiegel von Glucose-6-phosphat im Gehirn erniedrigt wird (GEY et al., 1965; KRIEGLSTEIN und STOCK, 1973; BIEBUYCK und HAWKINS, 1972; DEDRICK et al., 1975), was auf eine Beeinträchtigung der cerebralen Hexokinase hindeuten würde. Inwieweit die Hexokinase und die

Phosphofructokinase an der Hemmung der Glykolyse beteiligt sind, läßt sich deshalb besonders schwer entscheiden, weil in vivo die Aktivität der beiden Enzyme zum Teil von den gleichen physiologischen Substraten reguliert wird. Die vorliegende Arbeit sollte dazu beitragen, mehr Klarheit über den Angriffspunkt der Narkotika in der Glykolyse, und dadurch auch allgemein über die Wirkungsweise dieser Pharmaka, zu schaffen.

Ein Injektionsnarkotikum, Thiopental, wurde für die ersten Experimente ausgewählt. Die Versuche wurden am isoliert perfundierten Rattenhirn durchgeführt. KRIEGLSTEIN et al. (1972a, b) und KRIEGLSTEIN und STOCK (1974) konnten bereits zeigen, daß sich dieses Präparat besonders gut für Untersuchungen der Pharmakaeffekte am cerebralen Energiestoffwechsel eignet. Zur Trennung der ersten - als potentielle Angriffspunkte der Narkotika geltenden - Glykolyseschritte, der Hexokinase und der Phosphofructokinase, wurde in Versuchen mit Thiopental ein Antimetabolit des Nicotinamids, 6-Aminonicotinsäureamid, eingesetzt. Unter der Einwirkung dieser Substanz, die im Pentose-Phosphat-Weg eingreift, kommt es im Gehirn zu einer Hemmung der Glucose-6-phosphat-Isomerase, und auf diesem Wege zu einer Beeinträchtigung der Glykolyse (LANGE et al., 1970; KELLER et al., 1972; KAUFFMAN und JOHNSON, 1974; KRIEGLSTEIN und STOCK, 1975b). Es wäre anzunehmen, daß sich ein Narkotikumeffekt an der cerebralen Hexokinase oder Phosphofructokinase durch die Hemmung der Glucose-6-phosphat-Isomerase nach 6-Aminonicotinsäureamid deutlicher manifestieren kann. Neben dem Einfluß des Antimetaboliten auf die Thiopentaleffekte im cerebralen Energiestoffwechsel sollte an Hand des Elektroencephalogramms geprüft werden, ob das Narkosebild durch die Zusammenwirkung der beiden Substanzen verändert wird. Die Ergebnisse dieser Experimente brachten neben sehr interessanten Informationen zur Thiopentalwirkung auf die cerebrale Hexokinase auch einige neue Aspekte zur Wirkungsweise von 6-Aminonicotinsäureamid im Gehirn. Eine Hemmung der cerebralen Hexokinase deutete sich in der Thiopental-Narkose an, es war jedoch nicht zu entscheiden, ob das Enzym durch das Narkotikum selbst oder auf einem indirekten Wege beeinflusst wird. Die weiteren Untersuchungen sollten zur Klärung dieser Frage beitragen.

6-Aminonicotinsäureamid führte zu einer Veränderung der cerebralen Glutamatkonzentration; dieser Nebenfund dürfte angesichts der wesentlichen Rolle, die diese Aminosäure als putativer exzitatorischer Neurotransmitter im Zentralnervensystem spielt (CURTIS und WATKINS, 1960; McILWAIN und BACHELARD, 1971), nicht ohne Bedeutung für die Klärung der neurotoxischen Wirkungsweise des Antimetaboliten sein. Es ist bekannt, daß 6-Aminonicotinsäureamid erhebliche Funktionsstörungen in verschiedenen Organen hervorruft, wobei am stärksten das Zentralnervensystem betroffen ist (JOHNSON und McCOLL, 1955; COPER und HERKEN, 1963; BRUNNEMANN und COPER, 1963; HERKEN, 1968). Ob und inwieweit die oben erwähnte Störung des Pentose-Phosphat-Weges und der Glykolyse durch 6-Aminonicotinsäureamid an der Entstehung der neurotoxischen Effekte beteiligt ist, ist weitgehend unklar. Der sich in den Experimenten mit dem Antimetaboliten durch eine Veränderung der Glutamatkonzentration im Gehirn andeutende Einfluß auf den Neurotransmitterhaushalt stellte für die Forschung der Wirkungsweise der Substanz einen neuen Ansatzpunkt dar.

In ergänzenden Versuchen in vivo wurde geprüft, ob 6-Aminonicotinsäureamid neben den Effekten auf den Energiestoffwechsel, einschließlich seiner Wirkung auf den Glutamatspiegel im Gehirn, auch einen Einfluß auf δ -Aminobuttersäure (GABA) und Aspartat - zwei weitere putative Neurotransmittersubstanzen im Gehirn - hat. δ -Aminobuttersäure, ein inhibitorischer Neurotransmitter (OBATA et al., 1967; KRNEVIĆ und SCHWARTZ, 1967; OBATA und TAKEDA, 1969), wird im Gehirn aus Glutamat im sogenannten GABA-shunt, einem Nebenschluß zum Citronensäurezyklus, synthetisiert. Aspartat, das aus Glutamat über eine Transaminierungsreaktion entsteht, wird zu den exzitatorischen Aminosäuretransmittern gerechnet (GRAHAM et al., 1967; McILWAIN und BACHELARD, 1971). Die Effekte von 6-Aminonicotinsäureamid auf die Neurotransmitter im Gehirn wurden nach unterschiedlicher Einwirkungszeit des Antimetaboliten an Ratten in vivo geprüft. Aus diesen Untersuchungen ergaben sich zwar einige interessante Ansatzpunkte für die weitere Forschung, sie konnten jedoch nicht verfolgt werden, da vor allem die im Vordergrund der Arbeit stehende Frage nach dem Narkotikaeingriff im Energiestoffwechsel näher geklärt werden mußte.

Der Thiopentaleffekt an der cerebralen Hexokinase, der sich in den Experimenten an isoliert perfundierten Rattenhirnen andeutete, wurde in vitro und in vivo genauer untersucht. Aus der Literatur ist bekannt, daß dieses Enzym in der Zelle in einem an Mitochondrien gebundenen Zustand und nur zum Teil im Cytosol gelöst vorliegt (CRANE und SOLS, 1953; ABOOD et al., 1959; JOHNSON, 1960; BRUNNGRABER und ABOOD, 1960; CRAVEN und BASFORD, 1969; KROPP und WILSON, 1970). Damit bildet die Hexokinase eine Ausnahme unter den cerebralen Glykolyseenzymen, die fast ausschließlich im Cytosol zu finden sind (JOHNSON, 1960; McILWAIN und BACHELARD, 1971). Das Verteilungsverhältnis zwischen den beiden Formen kann durch bestimmte physiologische Substrate wie z. B. Glucose-6-phosphat, ATP, Phosphat reguliert werden (ROSE und WARMS, 1967; WILSON, 1968). Im Vergleich zu der gelösten Enzymform stellt die mitochondrielle das aktivere Kompartiment dar; sie hat eine kleinere Michaelis-Konstante für ATP und eine höhere Inhibitor-konstante für Glucose-6-phosphat (KARPATKIN, 1967; WILSON, 1968, TUTTLE und WILSON, 1970; KNUL et al., 1974). WILSON (1968), MOORE und JÖBSIS (1970), HOCHMAN und SACKTOR (1973) postulierten, daß es sich bei dem reversiblen Austausch der Hexokinaseaktivität zwischen Mitochondrien und Cytosol um einen dynamischen Regulationsprozeß der Enzymaktivität handelt. Möglicherweise beeinflussen Narkotika, direkt oder indirekt durch die in der Narkose veränderte Energiestoffwechsellaage, die intrazelluläre Aktivitätsverteilung der Hexokinase im Gehirn und auf die Weise auch die Aktivität des Enzyms.

Neben den Experimenten in vivo, in denen geklärt werden sollte, ob Thiopental die Aktivität der gelösten und der mitochondriellen Hexokinase bzw. die Gesamtaktivität des Enzyms im Gehirnhomogenat verändert, wurden also auch Versuche in vivo durchgeführt, in denen es den Einfluß von Thiopental auf das cerebrale Verteilungsgleichgewicht der beiden Hexokinaseformen zu prüfen galt. Da in der Thiopental-Narkose tatsächlich eine Verschiebung in der Verteilung der cerebralen Hexokinaseaktivität zu beobachten war, sollte als nächstes geklärt werden, ob dieser Effekt durch eine direkte Pharmakonwirkung auf das Enzym zustande kommt. Dazu wurde eine Reihe von Experimenten an der isolierten, mitochondriellen Hexokinase in vitro durchgeführt. Die Abhän-

gigkeit der Thiopentaleffekte von der Narkotikumdosis wurde sowohl in vivo als auch in vitro geprüft. Die Veränderungen in der cerebralen Verteilung der gelösten und der mitochondriellen Hexokinaseaktivität wurden auch in der Aufwachphase aus der Thiopental-Narkose verfolgt. Letztlich wurde untersucht, wie 6-Aminonicotinsäureamid das durch Thiopental veränderte Verteilungsgleichgewicht der Hexokinaseaktivität beeinflusst.

Angesichts der Ergebnisse der mit Thiopental durchgeführten Experimente erschien es interessant, auch die Wirkung anderer narkotisch wirksamer Pharmaka auf die intrazelluläre Aktivitätsverteilung der cerebralen Hexokinase zu untersuchen. Narkotika mit unterschiedlicher chemischer Struktur wurden zu den Untersuchungen herangezogen. Ihr Einfluß auf die cerebrale Verteilung der Enzymaktivität wurde unter in vivo-Bedingungen geprüft, die Fähigkeit, die an Mitochondrien gebundene Hexokinase direkt zu beeinflussen, in Experimenten in vitro untersucht.

Für die Frage der Korrelation der Narkotikaeffekte auf die cerebrale Verteilung der Hexokinaseaktivität mit dem Narkosezustand war wichtig zu prüfen, wie schnell sich Veränderungen im Verteilungsgleichgewicht des Enzyms nach Narkotika einstellen und zurückbilden. Mit Halothan, einem schnell an- und abflutenden Narkotikum, wurde das ermittelt.

Mit Pentetrazol wurde in Experimenten in vivo und in vitro untersucht, ob Analeptika einen Einfluß auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität haben, und ob sie - so wie sie den Narkosezustand aufheben - auch die Narkotikaeffekte auf das cerebrale Verteilungsgleichgewicht der Enzymaktivität aufheben können.

Es wurden Versuche mit verschiedenen Barbituraten durchgeführt, um die Korrelation der Effekte mit der Lipophilie der Pharmaka zu prüfen.

Anschließend wurde in einigen Experimenten mit Thiopental untersucht, ob auch andere die Glykolyserate regulierende Enzymschritte durch Narkotika beeinflusst werden. Die Phosphofructokinase, die mit der Hexokinase ein wichtiges Regulationssystem in der Glykolyse bildet (ROLLESTON und NEWSHOLME, 1967; LOWRY et al., 1964), war - wie schon früher erwähnt - im Zusam-

menhang mit der Narkose von besonderem Interesse. Aber auch Pyruvatkinase, die einen ähnlichen Kontrollschritt im Embden-Meyerhof-Weg darstellen dürfte (ROLLESTON und NEWSHOLME, 1967; McILWAIN und BACHELARD, 1971), könnte theoretisch an der Hemmung der Glykolyse unter Narkotika beteiligt sein.

Die intrazelluläre Aktivitätsverteilung dieser beiden Enzyme wurde, im Vergleich zu der Aktivitätsverteilung der Hexokinase im Gehirn, in der Thiopental-Narkose untersucht. In Experimenten *in vitro* wurde gleichzeitig geprüft, ob Thiopental einen direkten Einfluß auf die Aktivität der cerebralen Phosphofructokinase und Pyruvatkinase hat.

2. METHODIK

2.1. Material

Alle Untersuchungen wurden an männlichen, 200 - 300 g schweren Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. Bis zum Beginn des Experiments hatten die Tiere freien Zutritt zu Standard-Futter (Altromin^R) und Leitungswasser.

Bei den Untersuchungen wurden folgende Substanzen verwendet:

- Rinderserumalbumin, trocken, reinst (Behringwerke, Marburg),
- Thiopental (5-Äthyl-5-(1'-methyl-butyl)-thiobarbitursäure; Promonta, Hamburg),
- Hexobarbital (5-(1'-Cyclohexenyl)-1,5-dimethyl-barbitursäure Natriumsalz; Evipan^R-Natrium, Bayer, Leverkusen),
- Pentobarbital (5-Äthyl-5-pentyl(2')-barbitursäure Natriumsalz, Nembutal^R; Serva, Heidelberg),
- Amobarbital (Äthylisoamylbarbitursäure Natriumsalz, Amytal^R; Serva, Heidelberg),
- Barbital (5,5-Diäthylbarbitursäure; Serva, Heidelberg),
- Phenobarbital (5-Äthyl-5-phenyl-barbitursäure Natriumsalz; Merck, Darmstadt),
- Urethan (Äthylcarbamat; Merck, Darmstadt),
- Chloralhydrat (2,2,2-Trichlor-äthan-1,1-diol; Merck, Darmstadt),
- Ketamin (2-(o-Chlor-phenyl)-2-methylamino-cyclohexan-1-on-hydrochlorid, Ketanest^R; Parke-Davis, München),
- Äther (Diäthyläther; Merck, Darmstadt),
- Halothan (1,1,1-Trifluor-2-brom-2-chloräthan, Fluothane^R; Rhein-Pharma, Plankstadt),
- Pentetrazol (Pentamethylenetetrazol, Cardiazol^R; Knoll, Ludwigshafen),
- 6-Aminonicotinsäureamid (6-AN; Fluka, Buchs, Schweiz).

Die folgenden Enzyme, Coenzyme und Substrate wurden von Boehringer, Mannheim, bezogen:

- Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, G6P-DH (D-Glucose-6-phosphat: NADP-Oxidoreduktase, EC 1.1.1.49),
- Hexokinase (ATP: D-Hexose-6-Phosphotransferase, EC 2.7.1.1),
- Creatin-Kinase, CK (ATP: Creatin-Phosphotransferase, EC 2.7.3.2),
- Myokinase, MK (ATP: AMP-Phosphotransferase, EC 2.7.4.3),
- Pyruvat-Kinase, PK (ATP: Pyruvat-Phosphotransferase, EC 2.7.1.40),
- Lactat-Dehydrogenase, LDH (L-Lactat: NAD-Oxidoreduktase, EC 1.1.1.27),
- Amylo- α -1.4- α -1.6-glucosidase, AGS (α -1,4- α -1,6-Glucan-Glucosylhydrolase, EC 3.2.1.-),
- Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase, GDH (L-Glycerin-3-phosphat: NAD-Oxidoreduktase, EC 1.1.1.8),
- Triosephosphat-Isomerase, TIM (D-Glycerinaldehyd-3-phosphat - Ketol-Isomerase, EC 5.3.1.1),
- Phosphoglucose-Isomerase, PGI (D-Glucose-6-phosphat-Ketol-Isomerase, EC 5.3.1.9),
- Aldolase (Fructose-1,6-diphosphat-D-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Lyase, EC 4.1.2.13),
- Glutamat-Dehydrogenase, GLDH (L-Glutamat: NAD(P)-Oxidoreduktase (desaminierend), EC 1.4.1.3),
- 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, 6-PG-DH (6-Phospho-D-gluconat: NADP-Oxidoreduktase (decarboxylierend), EC 1.1.1.44),
- Glutamat-Oxalat-Transaminase, GOT (L-Aspartat-2-Oxoglutarat-Aminotransferase, EC 2.6.1.1),
- Malat-Dehydrogenase, MDH (L-Malat: NAD-Oxidoreduktase, EC 1.1.1.37),
- Adenosin-5'-triphosphat, ATP,
- Adenosin-5'-diphosphat, ADP,
- Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, NADP,
- β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxidierte Form), NAD,
- β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduzierte Form), NADH,
- Phosphoenol-pyruvat,

- Fructose-6-phosphat,
- α -Ketoglutar säure.

Von Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A., stammte Hepes [N-(2-Hydroxy-äthyl)piperazin-N'-2-äthylensulfonsäure], α -Thioglycerol und "GABA-se", gewonnen aus *Pseudomonas fluorescens* (γ -Aminobuttersäure-Glutamat-Transaminase + Succinat-Glutamat-Dehydrogenase).

Alle weiteren Chemikalien wurden in "pro analysi"-Qualität verwendet.

2.2. Untersuchungen des cerebralen Stoffwechsels

2.2.1. Experimente am isoliert perfundierten Rattenhirn

Das Präparat des isolierten Rattenhirns nach ANDJUS et al. (1967) bestand aus dem vom Unterkiefer befreiten Schädel mit Inhalt und extrakraniellen Muskelresten sowie den 3 bis 4 oberen Halswirbeln.

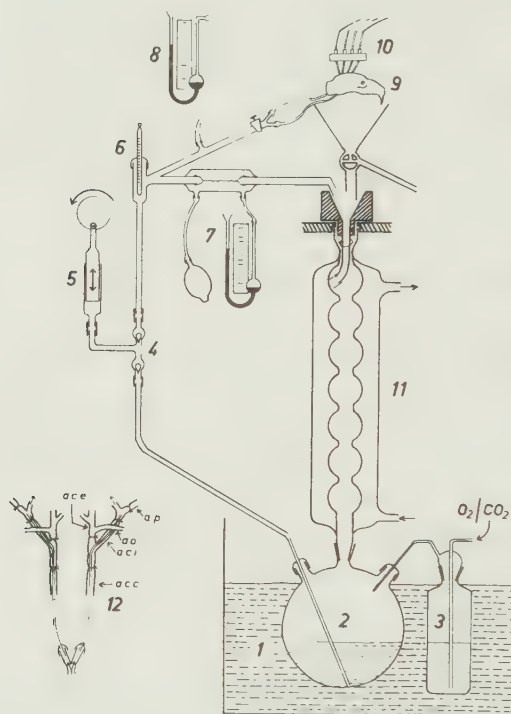
Das Gehirn wurde beiderseits über die Arteria carotis interna mit einem künstlichen Blut (Perfusionsmedium) versorgt. Die Perfusionsapparatur schematisch dargestellt in Abbildung 1, wurde von FLECK et al. (1972) beschrieben.

Die Perfusionen wurden rezirkulierend durchgeführt, d.h. das aus den beider Präparation angeschnittenen Venen abtropfende Perfusionsmedium wurde über einen Trichter in die Perfusionsapparatur zurückgeleitet. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug ca. 1,5 - 3 ml/min. der angelegte arterielle Druck, registriert über einen Druckwandler (type CEC-4-327-L-223, Bell & Howell Ltd., England), betrug 100 - 130 mm Hg.

Die Temperatur des Perfusionsmediums wurde im Vorratsgefäß auf 37°C eingestellt.

Für einen Perfusionsversuch waren 100 ml Perfusionsmedium erforderlich. Dieses enthielt 2 % Rinderserumalbumin, ca. 30 % gewaschene Erythrozyten und ca. 7,5 mM Glucose in Krebs-Henseleit-Lösung (KREBS und HENSELEIT).

Abbildung I: Perfusionsapparatur I (FLECK et al., 1972)



- 1 Wasserbad
- 2 Vorratsgefäß für das Perfusionsmedium
- 3 Waschflasche für Carbogen mit physiologischer Kochsalzlösung
- 4 und 5 Pumpe mit Ventil
- 6 Thermometer
- 7 Starlingwiderstand mit Manometer
- 8 Manometer zur Kontrolle des Perfusionsdrucks
- 9 Rattenschädel
- 10 Elektroden, die auf dem Schädeldach sitzen
- 11 Oxygenator
- 12 Schematische Darstellung der Gefäße mit eingebundenen Kathetern:
a. c. c. = arteria carotis communis, a. c. i. = arteria carotis interna,
a. c. e. = arteria carotis externa, a. o. = arteria occipitalis,
a. p. = arteria pterygopalatina

1932). Zur Untersuchung der Effekte von Thiopental auf das isolierte Gehirn wurde auch dieses Pharmakon im Perfusionsmedium gelöst.

Die Erythrozyten wurden aus Rinderblut, das nicht älter als 60 Stunden war, gewonnen. Das Blut wurde noch im Schlachthof mit isotonischer Natriumcitratlösung, die $55 \text{ mM} \approx 10 \text{ g/l}$ Glucose enthielt, verdünnt und bei 5°C gelagert. Zur Gewinnung der Erythrozyten wurde das mit Citrat versetzte Blut durch Zentrifugieren vom Plasma getrennt, zweimal mit 1 % Kochsalzlösung und einmal mit Krebs-Henseleit-Lösung gewaschen. Die sedimentierten Erythrozyten wurden zur Bereitung des Mediums verwendet. Der Hämatokrit, bestimmt in heparinisierten Kapillarröhrchen durch Zentrifugieren (Mikrohämatokritzentrifuge, Heraeus-Christ, Osterode), betrug ca. 29 - 31 %. Das pH des vor der Perfusion ca. 30 Minuten bei 37°C in der Apparatur zirkulierenden und mit Carbogen (95 % O_2 + 5 % CO_2) begasten Perfusionsmediums betrug 7,4.

Zur Prüfung der Effekte von Thiopental und 6-Aminonicotinsäureamid auf den cerebralen Energiestoffwechsel wurden vier Versuchsreihen aufgestellt:

1. Kontrollexperimente, die ohne Zusatz eines Pharmakons zum Perfusionsmedium durchgeführt wurden.
2. Experimente mit Thiopental, in denen das Perfusionsmedium das Narkotikum in einer Konzentration von 0,15 mM enthielt.
3. Experimente mit 6-Aminonicotinsäureamid, durchgeführt an den 17 Stunden vor dem Perfusionsbeginn mit diesem Antimetaboliten (35 mg/kg i. p.) vorbehandelten Tieren und ohne Zusatz von Thiopental zum Perfusionsmedium.
4. Experimente mit 6-Aminonicotinsäureamid und Thiopental, durchgeführt an den 17 Stunden vor dem Perfusionsbeginn mit dem Antimetaboliten (35 mg/kg i. p.) vorbehandelten Tieren und mit Thiopental im Perfusionsmedium (0,15 mM).

Während der Perfusionen wurde das Elektroencephalogramm (EEG) registriert, das bipolar von beiden Hemisphären über der Parietalregion abgeleitet, über ein Oszilloskop beobachtet und mit einem Schreiber aufgezeichnet wurde (EEG-Vorverstärker Nr. 19; Hellige, Freiburg).

Es wurden nur die Gehirnpräparate aufgearbeitet, bei denen während der gesamten Perfusionszeit eine etwa gleichbleibende elektrische Aktivität im EEG nachweisbar war.

Nach Ablauf der Perfusionszeit, die jeweils 30 Minuten betrug, wurde das isolierte Gehirn, noch während es von der Perfusionsapparatur mit dem Perfusionsmedium versorgt wurde, durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff eingefroren. Bis zur Aufarbeitung wurden die Präparate ebenfalls im flüssigen Stickstoff aufbewahrt.

2.2.2. Experimente an Ratten in vivo

Die Effekte von 6-Aminonicotinsäureamid auf den Energiestoffwechsel im Gehirn, mit besonderer Berücksichtigung von putativen Neurotransmittern wie Glutamat, γ -Aminobuttersäure und Aspartat, wurden an Ratten geprüft, die 17 Stunden vor der Aufarbeitung des Gewebes den Antimetaboliten (35 mg/kg i.p.) bekamen. Die zeitliche Abhängigkeit der Effekte wurde 6, 16 und 30 Stunden nach der Applikation der gleichen 6-Aminonicotinsäureamid-Dosis untersucht. Die zu dieser Zeit gemessene Körpertemperatur sank im Vergleich zu den Kontrollexperimenten von 39° C auf 38° C, 35° C und 34° C. Die Kontrolltiere bekamen 0,9 % Kochsalzlösung i.p..

Die Ratten wurden in einem röhrenförmigen Käfig aus Maschendraht mit dem Kopf voraus in flüssigen Stickstoff untergetaucht (LANGE et al., 1970). Nach etwa 2 - 3 Minuten wurden die durchgefrorenen Köpfe mit einem Meißel vom Rumpf getrennt und bis zur weiteren Aufarbeitung unter flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.2.3. Extraktion der physiologischen Substanzen

Die Aufarbeitung der Gehirne erfolgte im Kühlraum bei einer Temperatur von 0 bis -5° C.

Die Köpfe wurden longitudinal gespalten, Großhirn, Kleinhirn und teilweise der Hirnstamm schnell entnommen und in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser zu einem Pulver zerrieben. Auf einem vorgekühlten Wägpapier wurde das Gehirngewebepulver gewogen und in einem Zentrifugenglas mit der zehnfachen Menge vorgekühlter 0,6 N Perchlorsäure versetzt. Die enteivierte Suspension wurde anschließend 1 Minute lang mit einem Ultra-Turrax Homogenisator (Janke und Kunkel KG, Staufen i. Br.) homogenisiert. Zur Glykogen-Bestimmung wurden von dem Homogenat 0,2 ml entnommen, die restliche Suspension wurde 15 Minuten bei $2000 \times g$ und $0^{\circ}C$ zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde mit 5 M Kaliumcarbonat-Lösung gegen eine Glaselektrode (Schott, Mainz; Digitalmeter Digi 610, WTW Weilheim) auf pH 7 eingestellt. Das neutralisierte Homogenat wurde dann für eine Stunde im Eisbad gelassen. Das ausgefallene Kaliumperchlorat wurde vom Extrakt durch Absaugen über eine Glasfritte G 4 abgetrennt. Der filtrierte Extrakt wurde für die enzymatischen Bestimmungen der physiologischen Substrate und Metaboliten verwendet.

Die enzymatische Analyse begann sofort nach dem Aufarbeiten des Gehirngewebes und wurde spätestens am nächsten Tag abgeschlossen. Über Nacht wurden die Extrakte eingefroren aufbewahrt.

2.2.4. Enzymatische Bestimmungen

Folgende Substrate und Metaboliten wurden enzymatisch bestimmt:

Creatinphosphat, Adenosin-5'-triphosphat (ATP), Adenosin-5'-diphosphat (ADP), Adenosin-5'-monophosphat (AMP), Glykogen, D-Glucose (Glucose), D-Glucose-6-phosphat (Glucose-6-phosphat), D-Fructose-6-phosphat (Fructose-6-phosphat), L-(+)-Lactat (Lactat), Pyruvat, α -Ketoglutarat, L-Glutamat (Glutamat), γ -Aminobuttersäure (GABA), L-Aspartat (Aspartat), Ammoniak, 6-Phosphogluconat.

Die Bestimmung von γ -Aminobuttersäure wurde nach der Methode von JACOB (1962), modifiziert von GRAHAM und APRISON (1966), durchgeführt.

Alle anderen Vorschriften zur Bestimmung der einzelnen Substanzen wurden den "Methoden der enzymatischen Analyse" (BERGMEYER, 1970) entnommen. In Tabelle 2 sind die in den einzelnen Bestimmungen verwendeten Enzyme, Coenzyme und Reagenzien aufgeführt.

Das Prinzip der Bestimmungen stützte sich auf die Tatsache, daß Licht durch reduzierte Formen von Nicotinamid-adenin-dinucleotiden (NADH, NADPH) bei 340 nm mit einem Maximum absorbiert wird. Die oxydierten Formen (NAD, NADP) zeigen zwischen 300 - 400 nm keine Absorption. Durch Registrierung der Extinktionsabnahme bzw. -zunahme können alle Dehydrogenase-Reaktionen, bei denen NAD oder NADP reduziert oder NADH bzw. NADPH oxydiert werden, gemessen werden. Aus der Extinktionsdifferenz, die sich während der Reaktion ergibt, kann auf die Konzentration des umgesetzten Substrates geschlossen werden.

Die Messungen wurden bei 340 nm und bei 25° C mit dem Zeiss Photometer PMQ 2 bzw. PMQ 3, ausgestattet mit einer Spalt- und Küvettenautomatik (Zeiss, Oberkochen) und Servogor-Schreiber (Metrawatt, Nürnberg), durchgeführt.

Bei jeder Messung wurde ein Leerwert mitgeführt.

Zur Berechnung wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von $6,22 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$ eingesetzt. Die ausgerechneten Werte sind nicht für den Extrazellulärraum korrigiert und wurden in $\mu\text{Mol/g}$ Gehirn Feuchtgewicht angegeben. Konzentrationsangaben für Glykogen wurden in Glucose-Einheiten ausgedrückt ($1 \mu\text{Mol}$ entspricht $162 \mu\text{g}$).

Tabelle 2: Verwendete Enzyme, Coenzyme und Reagenzien zur enzymatischen Bestimmung der einzelnen Substrate und Metaboliten

Gemessene Substanzen	Puffer	Enzyme	Coenzyme, weitere Zusätze
Creatinphosphat, ATP	TRA pH 7,5	HK, G6P-DH, CK	NADP, Glucose, ADP, $MgCl_2$
ADP, AMP	TRA pH 7,5	LDH, PK, MK	NADH, Phosphoenol-pyruvat, $MgSO_4$, KCl
Glykogen	Acetat pH 4,8 TRA pH 7,5	AGS G6P-DH, HK	NADP, ATP, $MgSO_4$
Glucose	TRA pH 7,5	G6P-DH, HK	NADP, ATP, $MgSO_4$
Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat	TRA pH 7,6	G6P-DH, PGI	NADP, $MgCl_2$
Lactat	Hydrazin/Glycin pH 9,5	LDH	NAD, EDTA
Pyruvat	TRA pH 7,6	LDH	NADH, EDTA
α -Ketoglutarat	TRA pH 7,6	GIDH	NADH
Glutamat	Hydrazin/Glycin pH 9,5	GIDH	NAD
Aspartat	Phosphat pH 7,2	MDH, GOT	NADH, α -Ketoglutarat
γ -Aminobuttersäure	Pyrophosphat pH 8,4	"GABA"-se	NADP, α -Ketoglutarat
Ammoniak	Tris pH 8,0	GIDH	NADH, α -Ketoglutarat
6-Phosphogluconat	TRA pH 7,6	6-PG-DH	NADP, $MgCl_2$

TRA = Triäthanolamin, Tris = Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Weitere Abkürzungen sind unter 2.1.1. Material (S.18) angegeben.

2.3. Untersuchung der Rattenhirnhexokinase

Die Ratten wurden durch Genickschlag getötet, das Gehirn schnell entnommen und im vorgekühlten Potter-Elvehjem Homogenisator gewogen. Das Gehirngewebe wurde dann mit der zehnfachen Menge der eiskalten 0,25 M Saccharoselösung + 0,02 M Hepes-Puffer pH 7,5 versetzt und im Eisbad homogenisiert. Die Aufarbeitungszeit, gemessen bis zum Anfang des Homogenisierens, betrug ca. 2 Minuten und wurde bei jedem Experiment möglichst konstant eingehalten. Das Homogenisieren wurde standardisiert, indem jeweils 20 Hin- und Herbewegungen mit dem Teflonpistill des Homogenisators durchgeführt wurden. Die erhaltene Suspension wurde als Rohhomogenat bezeichnet, die in dieser Fraktion gemessene Hexokinaseaktivität als Rohhomogenat-Hexokinase. Durch Zentrifugieren des Rohhomogenats bei $41\,300 \times g$ für 15 Minuten wurde die sich im Überstand befindende gelöste Hexokinase abgetrennt (lösliche Fraktion). Die an Mitochondrien gebundene Hexokinase (mitochondrielle Hexokinase) wurde aus dem Rohhomogenat isoliert, indem dieses 15 Minuten bei $1000 \times g$ vorzentrifugiert wurde, der Überstand dann 15 Minuten bei $41\,300 \times g$ weiterzentrifugiert und das erhaltene Sediment in der sechs- bzw. zehnfachen Menge 0,25 M Saccharoselösung + 0,02 M Hepes-Puffer pH 7,5 (bezogen auf das Gewicht des angesetzten Gehirngewebes) resuspendiert wurde (mitochondrielle Fraktion). Alle Zentrifugationen wurden bei $0^{\circ}C$ durchgeführt. Die Fraktionierungsbedingungen der cerebralen Hexokinase sind nochmals in Abbildung 2 aufgeführt und stimmen mit denen, die von WILSON (1967) und KNULL et al. (1973) angegeben wurden, weitgehend überein.

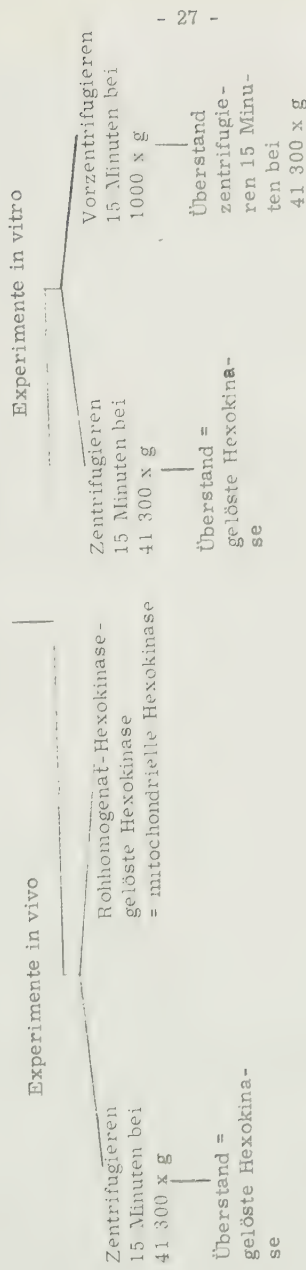
2.3.1. Untersuchung der Hexokinaseaktivität in vitro

Der Einfluß von Thiopental auf die Hexokinaseaktivität wurde sowohl im Rohhomogenat, das aus Gehirnen der unbehandelten Tiere hergestellt wurde, als auch in der löslichen und der mitochondrialen Fraktion untersucht. Die Konzentration von Thiopental im Meßansatz betrug 0,1 mM. In den Kontrollexperimenten wurde die Enzymaktivität ohne Thiopentalzusatz bestimmt.

Abbildung 2:

Fraktionierung des Gehirnhomogenates zur Untersuchung der Hexokinaseaktivität in vitro und in vivo

Homogenat in 0,25 M Saccharose
+ 0,02 M HEPES-Puffer pH 7,5
= Rohhomogenat-Hexokinase



Sediment in 0,25 M
Saccharose + 0,02 M
HEPES-Puffer pH 7,5
= mitochondrielle Hexo-
kinase

HEPES = N-(2-Hydroxyäthyl)piperazin-N'-2-äthylsulfonsäure

Die Enzymkinetik wurde zuerst unter den Bedingungen der optimalen Substratkonzentration (Glucose 3,3 mM, ATP 6,7 mM), dann aber auch mit unterschiedlichen Konzentrationen von Glucose (0,110, 0,055, 0,022, 0,011 mM) bzw. ATP (1,34, 0,67, 0,34, 0,17 mM) im Meßansatz geprüft.

2.3.2. Untersuchung der Aktivitätsverteilung der cerebralen Hexokinase in vivo

Zur Untersuchung der Effekte von Narkotika auf die Aktivitätsverteilung der Hexokinase im Gehirn wurden die Tiere mit folgenden Pharmaka behandelt:

Thiopental, 120 mg/kg,
Phenobarbital, 250 mg/kg,
Hexobarbital, 200 mg/kg,
Chloralhydrat, 350 mg/kg,
Ketamin, 150 mg/kg,
Urethan, 1,2 g/kg,
Halothan,
Äther.

Äther und Halothan wurden von den Tieren inhaliert (mit Narkotikum getränkte Wattemaske). Die Narkosetiefe wurde durch die Prüfung der Reflexe und der Pupillenweite beurteilt. Alle anderen Narkotika wurden den Ratten i. p. appliziert. Die Kontrolltiere bekamen 0,9 % Kochsalzlösung i. p., in den Versuchen mit Äther und Halothan blieben sie völlig unbehandelt. Die Narkosedauer betrug nach Äther und Halothan 20 Minuten, nach allen anderen Narkotika 30 Minuten. Nach dieser Zeit wurden die Tiere noch in Narkose getötet.

Die Dosisabhängigkeit des Thiopentaleffektes auf die cerebrale Aktivitätsverteilung der Hexokinase wurde nach einer i. p. -Injektion von 20, 40, 80, 120 und 160 mg/kg des Narkotikums geprüft.

Um den Einfluß von 6-Aminonicotinsäureamid und Thiopental auf die Aktivitätsverteilung der cerebralen Hexokinase zu prüfen, wurden Ratten zuerst 35 mg/kg des Antimetaboliten i. p. appliziert. Nach 17 Stunden bekamen sie zusätzlich 100 mg/kg Thiopental i. p., 30 Minuten danach wurden die Versuchstiere getötet.

Als Kontrollversuche dienten drei Versuchsreihen, in denen Ratten 35 mg/kg 6-Aminonicotinsäureamid, 100 mg/kg Thiopental oder 0,9 % Kochsalzlösung i. p. erhielten.

Zur Prüfung der Zusammenhänge zwischen den von Narkotika auf die cerebrale Aktivitätsverteilung der Hexokinase erzeugten Effekten und dem Narkosezustand wurden mehrere Versuchsreihen angesetzt.

Das cerebrale Aktivitätsgleichgewicht der Hexokinase wurde 30 Minuten (tiefe Narkose), 5 Stunden (Tiere noch benommen) und 17 Stunden (Tiere wieder wach) nach der Thiopentalapplikation (80 mg/kg i. p.) untersucht.

In Experimenten mit Halothan wurde die Aktivitätsverteilung der cerebralen Hexokinase gleich nach dem Eintreten der Narkose, d. h. schon nach 2 Minuten Narkotikuminhalation, nach der 10 Minuten dauernden Narkose und nach dem Aufwachen aus der 10 Minuten dauernden Narkose untersucht.

In Versuchen mit Phenobarbital (200 mg/kg i. p.) wurde die cerebrale Aktivitätsverteilung des Enzyms nach dem Aufheben der Narkose durch Pentetrazol (150 mg/kg i. p.) geprüft. Pentetrazol wurde 30 Minuten nach der Phenobarbitalinjektion den narkotisierten Tieren verabreicht, schon 4 - 5 Minuten danach wurden die Ratten wach. Wenn Pentetrazol allein appliziert wurde (150 mg/kg i. p.), wurden die Tiere 4 Minuten nach der Gabe des Analeptikums getötet, in Versuchen mit Phenobarbital (200 mg/kg i. p.) erst nach 30 Minuten. Die Kontrollratten bekamen 0,9 % Kochsalzlösung i. p. und wurden 30 Minuten danach getötet.

In allen Experimenten in vivo wurde die Hexokinaseaktivität im Rohhomogenat und nach der Rohhomogenatfraktionierung in der löslichen Fraktion gemessen. Die Aktivität der mitochondrialen Hexokinase wurde als Differenz aus der Enzymaktivität im Rohhomogenat und in der löslichen Fraktion ermittelt (Abbildung 2).

2.8.3. Untersuchung der Verschiebung der Hexokinaseaktivität von der mitochondrialen zur gelösten Enzymform in vitro

Zur Prüfung der Narkotikaeffekte auf die an Mitochondrien gebundene Hexokinase wurde die mitochondrielle Homogenatfraktion, gewonnen aus Gehirnen der unbehandelten Ratten (Abbildung 2), mit Pharmaka 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Die untersuchten Substanzen waren in 0,25 M Saccharoselösung gelöst, ihre Konzentration in der Inkubationssuspension betrug 1 mM. In den Kontrollversuchen wurde die mitochondrielle Hexokinasefraktion nur mit einer aliquoten Menge der 0,25 M Saccharoselösung inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Suspension bei 0°C und $41\,300 \times g$ 15 Minuten zentrifugiert und im Überstand die Aktivität der gelösten Hexokinase bestimmt.

Die Verschiebung der Hexokinaseaktivität zur gelösten Form wurde mit folgenden Narkotika geprüft: Thiopental, Phenobarbital, Hexobarbital, Chloralhydrat, Ketamin und Urethan.

Mit Thiopental wurde die Dosisabhängigkeit des Effektes untersucht, wobei die mitochondrielle Fraktion mit dem Narkotikum in Konzentrationen von 1, 0,8, 0,6, 0,2, 0,1 und 0,04 mM inkubiert wurde.

Um die Abhängigkeit des Effektes von der Lipophilie der Pharmaka zu prüfen, wurden Versuche mit verschiedenen Barbituraten wie Thiopental, Phenobarbital, Amobarbital, Hexobarbital, Pentobarbital und Barbitol, alle in einer Konzentration von 1 mM, durchgeführt. Die Verteilungskoeffizienten für das Wasser-Oktanöl-System wurden von LEO et al. (1971) übernommen.

Mit Thiopental und 6-Aminonicotinsäureamid bzw. mit Phenobarbital und Pentetrazol wurden analoge Versuche zu denen in vivo durchgeführt. Die Verschiebung der Hexokinaseaktivität zur gelösten Enzymform wurde mit 6-Aminonicotinsäureamid (1 mM) und Thiopental (1 mM), mit 6-Aminonicotinsäureamid (1 mM) oder Thiopental (1 mM) allein bzw. mit Pentetrazol (1 mM) und Phenobarbital (1 mM) und Pentetrazol (1 mM) oder Phenobarbital (1 mM) allein in der mitochondrialen Homogenatfraktion untersucht.

2.3.4. Bestimmung der Hexokinaseaktivität

Die Hexokinaseaktivität wurde nach einer modifizierten Methode von HERNANDEZ und CRANE (1966), wie von KNULL et al. (1973) beschrieben, durchgeführt.

Ein Meßansatz in der Küvette enthielt im Testvolumen von 1 ml:

3,3 mM Glucose, 6,7 mM ATP, 6,7 mM $MgCl_2$, 40 mM Hepes-Puffer pH 7,5, 10 mM α -Thioglycerol, 0,64 mM NADP und 1 U Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase.

Die Reaktion wurde durch eine Zugabe von verdünntem Hexokinasepräparat gestartet. Die Messung der NADPH-Bildung wurde bei 30°C und 340 nm durchgeführt. Die Extinktionszunahmerate wurde alle 30 Sekunden registriert und blieb über ca. 15 Minuten konstant.

Ein Kontrollansatz ohne Substrate und Kopplungsenzym (Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase) wurde mitgeführt, zeigte aber eine sehr niedrige Extinktionsabnahmerate und konnte bei der Berechnung vernachlässigt werden. Die Enzymaktivität wurde in U/g Gehirngewebe (Feuchtgewicht) angegeben (U = 1 Einheit des Enzyms als 1 μ Mol NADPH/min).

2.4. Untersuchung der cerebralen Phosphofructokinase und Pyruvatkinase

2.4.1. Untersuchung der cerebralen Aktivitätsverteilung der Phosphofructokinase und Pyruvatkinase

Die Aufarbeitungsbedingungen stützten sich auf die Methodik, die von JOHNSON (1960) für die Untersuchung der intrazellulären Verteilung der glykolytischen Enzyme angegeben wurde.

Das Rohhomogenat wurde mit 0,3 M Saccharoselösung, wie für Hexokinase beschrieben, hergestellt. Aus dem Rohhomogenat wurde der Überstand durch Zentrifugieren bei 20 000 x g für 30 Minuten abgetrennt. Das Sediment wurde einmal mit 0,3 M Saccharoselösung gewaschen, unter denselben Bedingungen noch einmal zentrifugiert und in 0,3 M Saccharoselösung resuspendiert.

Die im Überstand gemessene Enzymaktivität wurde dem im Cytosol gelösten Enzymanteil zugeordnet, die im Sediment der mitochondriellen Enzymform. Die cerebrale Aktivitätsverteilung der beiden Enzyme wurde in Thiopental-Narkose (100 mg/kg i. p.), 30 Minuten nach der Narkotikumapplikation, untersucht. Zum Vergleich wurde unter denselben Bedingungen die Aktivitätsverteilung der Hexokinase mitbestimmt.

2. 4. 2. Untersuchung der Aktivität der cerebralen Phosphofructokinase und Pyruvatkinase in vitro

Der Thiopentaleinfluß auf die Aktivität der beiden Enzyme wurde im Rohhomogenat untersucht. Die Konzentration von Thiopental im Meßansatz betrug 0,3 mM. In den Kontrollexperimenten wurde die Aktivität der Phosphofructokinase und der Pyruvatkinase ohne Thiopentalzusatz bestimmt. Die Enzymkinetik wurde mit unterschiedlicher Konzentration von entsprechenden Substraten gemessen. Bei der Messung der Phosphofructokinaseaktivität betrug die Fructose-6-phosphat-Konzentration 0,350, 0,175, 0,088 und 0,044 mM bei einer ATP-Konzentration von 0,44 mM. Bei der Fructose-6-phosphat-Konzentration von 7 mM wurde die ATP-Konzentration von 0,110, 0,055, 0,027 bis 0,011 variiert.

Zur Bestimmung der Pyruvatkinaseaktivität wurde bei einer konstanten ADP-Konzentration (0,23 mM) die Konzentration von Phosphoenol-pyruvat von 0,050, 0,0250, 0,0125 bis 0,0050 mM verändert, bei einer gleichbleibenden Phosphoenol-pyruvat-Konzentration (0,8 mM) die Konzentration von ADP von 0,0560, 0,0280, 0,0140 bis 0,0028 mM variiert.

2. 4. 3. Bestimmung der Phosphofructokinase- und Pyruvatkinaseaktivität

Beide Bestimmungen basierten auf der Messung der Konzentrationsänderung von NADH. Diese wurde bei 340 nm und 30°C alle 30 Sekunden registriert. Die Aktivität der Phosphofructokinase wurde nach einer Methode von RACKER

(1947) bestimmt. Die Bestimmung wurde von JOHNSON (1960) modifiziert und beschrieben. Der Phosphat-Puffer wurde durch einen Tris-Puffer ersetzt.

Ein Meßansatz enthielt in 3 ml Testvolumen:

50 mM Tris-Puffer pH 7,4, 2 mM $MgCl_2$, 7 mM Cysteinhydrochlorid, 7 mM Fructose-6-phosphat, 0,44 mM ATP, 80 μ M NADH, 5 μ g Triosephosphat-Isomerase, 4,5 μ g Glycerophosphat-Dehydrogenase und 0,5 U Aldolase.

Die Aktivität der Pyruvatkinase wurde nach der Methode von BÜCHER und PFLEIDERER (1955) gemessen, wie von JOHNSON (1960) beschrieben.

Ein Meßansatz enthielt in 3 ml Testvolumen:

50 mM Triäthanolamin-Puffer pH 7,4, 75 mM KCl, 8 mM $MgCl_2$, 0,23 mM ADP, 0,8 mM Phosphoenol-pyruvat, 80 μ M NADH und 0,6 U Lactat-Dehydrogenase.

Die Extinktionsabnahmerate blieb bei den beiden Bestimmungen über ca. 10 Minuten linear. Die Kontrollwerte wurden ohne Substrate und Kopplungsenzyme mitbestimmt. Bei der Messung der Pyruvatkinaseaktivität waren sie stets sehr niedrig und konnten vernachlässigt werden, bei der Messung der Phosphofructokinaseaktivität betrugen sie ca. 20 - 25 % der gesamten Extinktionsabnahmerate und wurden bei der Berechnung berücksichtigt.

Die Enzymaktivität wurde in U/g Gehirngewebe (Feuchtgewicht) angegeben (U = 1 Einheit des Enzyms als 1 μ Mol NAD/min).

2.5. Statistische Auswertung

Die Werte wurden als Einzelwerte oder Mittelwerte aus n Versuchen angegeben. Streuungsangaben stellen den mittleren Fehler des Mittelwertes dar ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$). In den Perfusionsversuchen wurde die Signifikanz der Ergebnisse mit Hilfe von Varianzanalyse und Scheffé-Test (GUENTHER, 1964) geprüft. In allen anderen Experimenten wurde zum statistischen Vergleich der Mittelwerte der t-Test nach Student verwendet. In Versuchen, in denen die Aktivitätsverteilung der cerebralen Hexokinase mit verschiedenen Dosen von Thio-pental in vivo und in vitro geprüft wurde, wurde eine Regressionsanalyse

durchgeführt. In Experimenten, in denen die Hexokinase-, Phosphofructokinase und Pyruvatkinaseaktivität *in vitro* untersucht wurden, wurden einzelne Meßwerte angegeben. Auch bei den Bestimmungen der Aktivitätsverteilung der cerebralen Phosphofructokinase und Pyruvatkinase wurden die Ergebnisse als Einzelwerte zusammengestellt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Einfluß von Thiopental und 6-Aminonicotinsäureamid auf den Energiestoffwechsel im isoliert perfundierten Rattenhirn

Die Veränderungen im cerebralen Energiestoffwechsel, die durch Thiopental und 6-Aminonicotinsäureamid bzw. durch eine Zusammenwirkung der beiden Substanzen zustande kamen, sind aus Tabelle 3 und Abbildung 3 ersichtlich. Der Einfluß der beiden Substanzen auf die cerebrale Konzentration von 6-Phosphogluconat wird in Tabelle 4 dargestellt.

Nach der Perfusion isolierter Rattenhirne mit dem Thiopental (0,15 mM) enthaltenden Medium stieg die cerebrale Glucosekonzentration auffällig an (Abbildung 3). Gleichzeitig konnte eine merkliche Zunahme des Creatinphosphatspiegels beobachtet werden, während die Konzentration von Adenosinphosphaten unverändert blieb (Tabelle 3). Die Lactatkonzentration war erniedrigt, auch die Pyruvatkonzentration zeigte eine Abnahmetendenz (Tabelle 3). Eine Vorbehandlung der Tiere mit 6-Aminonicotinsäureamid (35 mg/kg i.p.) war mit einer sehr stark ausgeprägten Zunahme der Konzentration von 6-Phosphogluconat im Gehirn verbunden (Tabelle 4). Der Anstieg von 6-Phosphogluconat war von anderen bedeutenden Veränderungen im Energiestoffwechsel begleitet (Tabelle 3). Die cerebrale Glucosekonzentration war doppelt so hoch wie in den Kontrollversuchen, die Glucose-6-phosphat-Konzentration stieg ebenfalls sehr stark an. Der Lactatgehalt wurde dagegen deutlich erniedrigt. Während die Konzentration von Creatinphosphat praktisch unverändert blieb, wurde der Spiegel der Adenosinphosphate nach der Vorbehandlung mit 6-Aminonicotinsäureamid signifikant erniedrigt. Der Gehalt an ADP und AMP im Gehirn veränderte sich nicht, dagegen nahm die ATP-Konzentration signifikant ab.

Eine deutliche Abnahme der Glutamatkonzentration (Tabelle 3) deutete auf einen möglichen Effekt von 6-Aminonicotinsäureamid auf putative Neurotransmitter hin.

Tabelle 3 - Einfluss von Thiopental und/oder 6-An. auf die Wasser- und Elektrolyt- und den Energiestoffwechsel des isoliert perfundierten Rattenhirns

	(a)	(b)	(c)	(d)
Creatinphosphat	2,31 $\pm$ 0,51	3,62 $\pm$ 0,38 •	2,95 $\pm$ 0,50	3,42 $\pm$ 0,21
ATP	2,14 $\pm$ 0,25	2,46 $\pm$ 0,35	1,87 $\pm$ 0,21	2,13 $\pm$ 0,15
ADP	0,70 $\pm$ 0,14	0,62 $\pm$ 0,09	0,64 $\pm$ 0,08	0,69 $\pm$ 0,30
AMP	0,29 $\pm$ 0,11	0,20 $\pm$ 0,04	0,21 $\pm$ 0,05	0,20 $\pm$ 0,04
ATP + ADP + AMP	3,13 $\pm$ 0,36	3,27 $\pm$ 0,37	2,71 $\pm$ 0,17 o	3,01 $\pm$ 0,23
Glykogen	1,99 $\pm$ 0,44	2,38 $\pm$ 0,94	1,54 $\pm$ 0,31	2,13 $\pm$ 0,22
Fructose-6-phosphat	0,017 $\pm$ 0,005	0,017 $\pm$ 0,004	0,017 $\pm$ 0,001	0,017 $\pm$ 0,008
Lactat	0,67 $\pm$ 1,04	3,17 $\pm$ 1,25 ••	3,08 $\pm$ 0,56 ••	1,34 $\pm$ 0,23 ••
Pyruvat	0,22 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,06	0,23 $\pm$ 0,15	0,10 $\pm$ 0,05
Lactat/Pyruvat	23,58 $\pm$ 3,60	21,90 $\pm$ 4,26	17,14 $\pm$ 7,62	18,37 $\pm$ 7,85
α -Ketoglutarat	0,091 $\pm$ 0,022	0,082 $\pm$ 0,027	0,073 $\pm$ 0,019	0,076 $\pm$ 0,021
Glutarat	11,51 $\pm$ 1,25	16,32 $\pm$ 0,42	8,37 $\pm$ 1,06 ••	16,22 $\pm$ 1,85
Ammoniak	0,52 $\pm$ 0,20	0,43 $\pm$ 0,14	0,52 $\pm$ 0,19	0,54 $\pm$ 0,06

(a) Kontrollversuche, n=8

(b) Thiopentalversuche: 0,15 mM Thiopental im Perfusionsmedium, n=7

(c) 6-An.-Versuche: Ratten mit 6-An. vorbehandelt (35 mg/kg i. p.), Perfusionsmedium ohne Thiopental, n=8

(d) 6-An. + Thiopental-Versuche: Ratten mit 6-An. vorbehandelt (35 mg/kg i. p.), 0,15 mM Thiopental im Perfusionsmedium, n=7

Die Werte sind angegeben als $\bar{x} \pm s$, in $\mu\text{Mol/g Gehirn (Feuchtgewicht)}$.

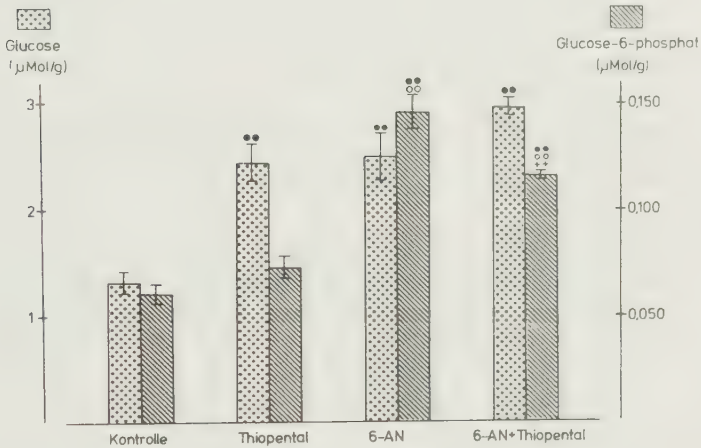
Die Effekte wurden statistisch mit einer Varianzanalyse und dem Scheffé-Test geprüft.

Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber den Kontrollversuchen (a): • $p < 0,05$, •• $p < 0,01$

Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber dem Thiopentalversuchen (b): o $p < 0,05$, oo $p < 0,01$

Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber den 6-An.-Versuchen (c): ! $p < 0,05$

Abbildung 3: Einfluß von Thiopental und/oder 6-Aminonicotinsäureamid (6-AN) auf die Glucose- und Glucose-6-phosphat-Konzentration im isoliert perfundierten Rattenhirn



Die Säulen stellen Mittelwerte dar, Streuungen sind als mittlerer Fehler des Mittelwertes angegeben. Die Anzahl der Versuche und die Versuchsbedingungen wurden in Tabelle 3 angegeben. Die Effekte wurden statistisch mit einer Varianzanalyse und dem Scheffee-Test geprüft.

Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber den Kontrollversuchen:

●● $p < 0,01$, gegenüber den Thiopentalversuchen: ○○ $p < 0,01$, gegenüber den 6-AN-Versuchen: ++ $p < 0,01$.

Tabelle 4. Konzentrationen von 6-Phosphogluconat im isoliert perfundierten Rattenhirn nach der Applikation von 6-Aminonicotinsäureamid (6-AN) und/oder Thiopental

	6-Phosphogluconat
(a) Kontrollversuche	0,016 $\pm$ 0,002
(b) Thiopentalversuche	0,015 $\pm$ 0,002
(c) 6-AN-Versuche	2,04 $\pm$ 0,02
(d) 6-AN + Thiopental-Versuche	2,05 $\pm$ 0,05

(a) Kontrollversuche ohne Pharmakonzusatz im Perfusionsmedium, n=4

(b) Thiopentalversuche: 0,15 mM Thiopental im Perfusionsmedium, n=4

(c) 6-AN-Versuche: Ratten mit 6-Aminonicotinsäureamid vorbehandelt (35 mg/kg i. p.), Perfusionsmedium ohne Thiopental, n=4

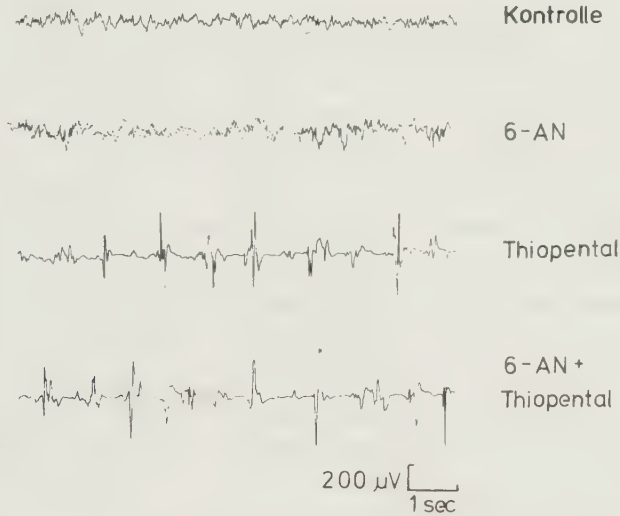
(d) 6-AN + Thiopental-Versuche: Ratten mit 6-Aminonicotinsäureamid vorbehandelt (35 mg/kg i. p.), 0,15 mM Thiopental im Perfusionsmedium, n=4

Die Werte sind angegeben als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ in $\mu\text{Mol/g}$ Gehirn (Feuchtgewicht),

In Versuchen, in denen Gehirne der mit dem Antimetaboliten vorbehandelten Ratten mit einem thiopentalhaltigen (0,15 mM) Medium perfundiert wurden, zeigte sich im Vergleich zu den Experimenten mit Thiopental oder 6-Aminonicotinsäureamid allein eine Tendenz zur weiteren Zunahme der cerebralen Glucosekonzentration (Abbildung 3). Dabei war der Gehalt an Glucose-6-phosphat im Gehirn niedriger als nach der Behandlung mit dem Antimetaboliten allein, aber doch noch signifikant höher als in den Kontrollversuchen (Abbildung 3). Die Lactatkonzentration wurde unter der Zusammenwirkung der beiden Substanzen im Vergleich zu den Experimenten mit 6-Aminonicotinsäureamid oder Thiopental noch um ca. 50 % reduziert (Tabelle 3).

Bei allen Versuchen an isoliert perfundierten Rattenhirnen wurde das Elektroencephalogramm (EEG) abgeleitet. Die für einzelne Versuchsreihen typischen EEG-Muster sind in Abbildung 4 dargestellt.

Abbildung 4: Elektroencephalogramm (EEG) des isolierten Rattenhirns nach 6-Aminonicotinsäureamid und/oder Thiopental



Das EEG wurde bipolar von beiden Hemisphären über die Parietalregion abgeleitet. Die Abbildung zeigt jeweils eine der in der Regel symmetrischen und synchronen Kurven nach 25 Minuten Perfusion. Die Versuche wurden wie in Tabelle 3 angegeben durchgeführt.

Unter Thiopental konnte ein charakteristisches Narkose-EEG registriert werden; die vermehrt auftretenden langsamen Wellen, mit einer geringeren Amplitude im Theta- und Deltabereich, wurden durch einzelne sporadische und isolierte Spitzenentladungen unterbrochen. Die Vorbehandlung der Ratten mit 6-Aminonicotinsäureamid veränderte die Effekte von Thiopental auf das EEG nicht. Auch nach 6-Aminonicotinsäureamid allein wurden, im Vergleich zu den Kontrollversuchen, keine EEG-Veränderungen beobachtet.

3.2. Einfluß von 6-Aminonicotinsäureamid auf die Konzentration von Glutamat, γ -Aminobuttersäure und Aspartat im Rattenhirn in vivo

Der cerebrale Gehalt von Glutamat, γ -Aminobuttersäure, Aspartat und anderen Substraten und Metaboliten des Energiestoffwechsels nach der Behandlung mit 6-Aminonicotinsäureamid (35 mg/kg i. p.) ist aus Tabelle 5 zu entnehmen. 17 Stunden nach der Gabe des Antimetaboliten konnte, ähnlich wie in den Versuchen mit isoliert perfundierten Rattenhirnen, eine sehr starke Anreicherung von 6-Phosphogluconat gezeigt werden. Es waren auch andere für das Pharmakon typische Veränderungen im Energiestoffwechsel festzustellen. Die Konzentration von Glucose stieg um das Zweifache an, der Glucose-6-phosphat-Gehalt war auffällig erhöht. Der Lactatgehalt nahm im Gehirn signifikant ab, es konnte auch eine Abnahme der Pyruvatkonzentration gezeigt werden. Ein Abfall der ATP-Werte unter der Einwirkung von 6-Aminonicotinsäureamid war deutlich zu registrieren, die ADP- und AMP-Konzentrationen blieben dabei unverändert. Signifikante Veränderungen in der Konzentration von Creatinphosphat waren nicht zu beobachten.

Die Konzentrationen von Glutamat und γ -Aminobuttersäure, zwei am GABA-shunt beteiligten Substanzen, waren 17 Stunden nach der Injektion von 6-Aminonicotinsäureamid deutlich erniedrigt (Tabelle 5). Der Aspartatspiegel blieb dagegen unverändert.

Ein Teil der Effekte schien eine gewisse Abhängigkeit von der Einwirkungszeit des Antimetaboliten zu zeigen (Tabelle 6). So nahm die Konzentration von 6-Phosphogluconat im Gehirn schon 6 Stunden nach der Applikation von 6-Aminonicotinsäureamid erheblich zu. Das Anstiegsmaximum wurde jedoch erst nach 16 Stunden erreicht. Der hohe Spiegel von 6-Phosphogluconat blieb dann auch 30 Stunden nach der Pharmakongabe unverändert hoch.

Die Konzentrationen von Lactat und Pyruvat waren schon nach 6 Stunden deutlich erniedrigt und schienen mit der zunehmenden Einwirkungszeit des Antimetaboliten keinen weiteren deutlichen Veränderungen zu unterliegen. 6 Stunden nach der Behandlung mit 6-Aminonicotinsäureamid waren keine signifikanten Veränderungen im Glutamat- und γ -Aminobuttersäuregehalt im Gehirn nachzuweisen.

Tabelle 5: Einfluß von 6-Aminonicotinsäureamid auf Substrate und Metaboliten des Energiestoffwechsels und des GABA-shunts im Rattenhirn in vivo

	Kontrollen	6-Aminonicotinsäure- amid
Creatinphosphat	2,97 $\pm$ 0,07	3,17 $\pm$ 0,09
ATP	2,15 $\pm$ 0,04	1,94 $\pm$ 0,05 +
ADP	0,57 $\pm$ 0,02	0,51 $\pm$ 0,02
AMP	0,14 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01
ATP + ADP + AMP	2,86 $\pm$ 0,06	2,59 $\pm$ 0,06 +
Glucose	1,22 $\pm$ 0,07	2,71 $\pm$ 0,13 +
Glucose-6-phosphat	0,091 $\pm$ 0,006	0,140 $\pm$ 0,005 +
Fructose-6-phosphat	0,021 $\pm$ 0,002	0,020 $\pm$ 0,002
Pyruvat	0,100 $\pm$ 0,006	0,061 $\pm$ 0,005 +
Lactat	2,29 $\pm$ 0,15	1,20 $\pm$ 0,09 +
α -Ketoglutarat	0,100 $\pm$ 0,010	0,080 $\pm$ 0,021
Glutamat	8,22 $\pm$ 0,46	6,40 $\pm$ 0,42 +
γ -Aminobuttersäure	1,91 $\pm$ 0,06	1,39 $\pm$ 0,05 +
Aspartat	2,56 $\pm$ 0,04	2,58 $\pm$ 0,08
Ammoniak	0,38 $\pm$ 0,04	0,40 $\pm$ 0,04
6-Phosphogluconat	0,020 $\pm$ 0,002	2,04 $\pm$ 0,12 +

Den Ratten wurden 35 mg/kg 6-Aminonicotinsäureamid i. p. appliziert. 17 Stunden danach wurden die Tiere getötet. Die Kontrolltiere bekamen 0,9 % Kochsalzlösung i. p.. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, Konzentrationen in $\mu\text{Mol/g}$ Gehirn (Feuchtgewicht) angegeben. Anzahl der durchgeführten Experimente $n = 12$. Die Effekte wurden mit dem t-Test nach Student geprüft. Statistisch signifikante Änderungen gegenüber Kontrollen: + $p < 0,01$.

Tabelle 6: Einfluß von 6-Aminonicotinsäureamid auf den cerebralen Stoffwechsel
- Abhängigkeit der Effekte von der Einwirkungszeit des Antimetaboliten -

	Kontrolle	Zeit nach der Applikation von 6-Aminonicotinsäureamid		
		6 Stunden	16 Stunden	30 Stunden
Creatinphosphat	3,06 $\pm$ 0,14	2,89 $\pm$ 0,06	2,89 $\pm$ 0,09	2,82 $\pm$ 0,08
ATP	2,09 $\pm$ 0,06	1,97 $\pm$ 0,03	1,92 $\pm$ 0,06	1,62 $\pm$ 0,09 ++
Lactat	2,33 $\pm$ 0,21	1,00 $\pm$ 0,13 ++	1,23 $\pm$ 0,11 ++	0,95 $\pm$ 0,08 ++
Pyruvat	0,091 $\pm$ 0,003	0,060 $\pm$ 0,009 ++	0,060 $\pm$ 0,005 ++	0,061 $\pm$ 0,006 ++
Glutamat	9,32 $\pm$ 0,58	9,16 $\pm$ 0,61	7,75 $\pm$ 0,56	6,86 $\pm$ 0,53 +
γ -Aminobuttersäure	1,70 $\pm$ 0,10	1,52 $\pm$ 0,06	1,38 $\pm$ 0,08 +	1,28 $\pm$ 0,07 ++
6-Phosphogluconat	0,021 $\pm$ 0,002	1,07 $\pm$ 0,08 ++	2,08 $\pm$ 0,13 ++	1,94 $\pm$ 0,11 ++

Die Versuchstiere bekamen 6-Aminonicotinsäureamid (35 mg/kg i. p.), die Kontrollratten nur 0,5 % Kochsalzlösung i. p.. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils 6 Experimenten angegeben. Die Konzentrationsangaben in $\mu\text{Mol/g}$ Gehirn (Feuchtgewicht). Die Effekte wurden mit dem t-Test nach Student geprüft. Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber den Kontrollen: + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$.

Erst 16 Stunden nach der Pharmakonapplikation konnte eine Abnahme der cerebralen γ -Aminobuttersäurekonzentration registriert werden (Tabelle 6). Auch die Glutamatkonzentration zeigte zu dieser Zeit eine Abnahmetendenz. Diese Veränderungen schienen 30 Stunden nach der Applikation des Antimetaboliten weiter zuzunehmen; der Gehalt von Glutamat war signifikant erniedrigt, die Abnahme der Konzentration von γ -Aminobuttersäure schien im Vergleich zu den Werten nach 16 Stunden fortzuschreiten.

3.3. Einfluß von Thiopental auf die Rattenhirnhexokinase

3.3.1. Einfluß von Thiopental auf die Aktivität der cerebralen Hexokinase in vitro

Es wurde die Einwirkung von Thiopental (0,1 mM) auf die Aktivität der cerebralen Hexokinase geprüft. Zuerst wurden die Messungen unter einer optimalen Substratkonzentration im Testvolumen, d.h. mit der Glucosekonzentration von 3,3 mM und der ATP-Konzentration von 6,7 mM, durchgeführt. Wie aus Tabelle 7 zu entnehmen ist, hatte Thiopental unter diesen Bedingungen weder im Rohhomogenat noch in der löslichen oder der mitochondriellen Gehirnhomogenatfraktion einen Einfluß auf die Hexokinaseaktivität.

Mit derselben Pharmakonkonzentration (0,1 mM) wurde die Hexokinaseaktivität unter einer variierten Glukose- und ATP-Konzentration im Testvolumen untersucht (Tabelle 8). Auch in diesen Experimenten konnten keine Effekte von Thiopental auf die Enzymaktivität nachgewiesen werden.

Tabelle 7: Einfluß von Thiopental auf die Hexokinaseaktivität im Rohhomogenat, in der löslichen und der mitochondriellen Fraktion aus Rattenhirn in vitro

Versuchsnr.	1	2	3	4	5	6	7
Hexokinaseaktivität (U/g)							
Rohhomogenat							
Kontrolle	8,58	8,52	8,67	8,72	9,43	11,00	10,64
Thiopental	8,86	8,84	9,22	7,84	8,46	12,03	10,45
Lösliche Fraktion							
Kontrolle	1,93	1,96	2,31	1,66	2,21	2,15	2,17
Thiopental	1,93	2,09	2,31	1,55	2,28	2,17	2,23
Mitochondrielle Fraktion							
Kontrolle	3,52	2,30	3,72	2,49	3,09	3,34	3,54
Thiopental	3,28	2,24	3,72	2,61	3,28	3,22	3,56

Die Gehirne der unbehandelten Tiere wurden wie im Kapitel Methodik unter 2. 3. und 2. 3. 1. angegeben aufgearbeitet. Die Hexokinaseaktivität wurde in jeder Fraktion ohne Thiopentalzusatz (Kontrolle) und mit 0,1 mM Thiopental bestimmt. Die Glucose- und ATP-Konzentration im Meßansatz betragen 3,3 mM und 6,7 mM. Die Werte sind in U/g Gehirngewebe (Feuchtwicht) angegeben.
U = 1 Einheit des Enzyms als 1 μ Mol NADPH/min.

Tabelle 8: Einfluß von Thiopental auf die Aktivität der Rattenhirnhexokinase in vitro

Thiopental	Glucose mM	ATP mM	Hexokinaseaktivität U/g
ROHHOMOGENAT			
+	0,110	6,7	6,97
-	0,110	6,7	6,97
+	0,055	6,7	5,63
-	0,055	6,7	5,64
+	0,022	6,7	3,75
-	0,022	6,7	3,75
+	0,011	6,7	2,20
-	0,011	6,7	2,20
+	3,3	0,67	7,50
-	3,3	0,67	7,48
+	3,3	0,34	4,64
-	3,3	0,34	4,66
+	3,3	0,17	2,95
-	3,3	0,17	2,92
LÖSLICHE FRAKTION			
+	0,110	6,7	1,238
-	0,110	6,7	1,264
+	0,055	6,7	0,965
-	0,055	6,7	0,965
+	0,022	6,7	0,627
-	0,022	6,7	0,627
+	0,011	6,7	0,322
-	0,011	6,7	0,323
+	3,3	1,34	1,479
-	3,3	1,34	1,490
+	3,3	0,67	1,115
-	3,3	0,67	1,114
+	3,3	0,34	0,740
-	3,3	0,34	0,740

Fortsetzung Seite 46

Fortsetzung Tabelle 8:

Thiopental	Glucose mM	ATP mM	Hexokinaseaktivität U/g
MITOCHONDRIELLE FRAKTION			
+	0,110	6,7	6,43
-	0,110	6,7	6,29
+	0,055	6,7	5,10
-	0,055	6,7	5,00
+	0,022	6,7	3,29
-	0,022	6,7	3,32
+	0,011	6,7	2,30
-	0,011	6,7	2,32
+	3,3	0,67	4,23
-	3,3	0,67	4,18
+	3,3	0,34	3,54
-	3,3	0,34	3,54
+	3,3	0,17	2,25
-	3,3	0,17	2,25

Die Gehirne der unbehandelten Tiere wurden, wie im Kapitel 2.3. und 2.3.1. angegeben, aufgearbeitet. Die Hexokinaseaktivität wurde unter der jeweils variierten Glucose- bzw. ATP-Konzentration gemessen. Die Konzentration von anderen Reagentien im Meßansatz war wie unter 2.3.4. beschrieben. Die Thiopentalkonzentration im Meßansatz betrug 0,1 mM.

Die Werte sind in U/g Gehirn (Feuchtgewicht) angegeben.

(U = 1 Einheit des Enzyms, angegeben als 1 μ Mol NADPH/min.)

3.3.2. Einfluß von Thiopental auf die Aktivitätsverteilung der cerebralen Hexokinase in vivo

Die cerebrale Verteilung der Hexokinaseaktivität in den Kontrollversuchen und in der Thiopental-Narkose (120 mg/kg i. p.) ist in Tabelle 9 angegeben. Es zeigte sich, daß Thiopental zu einer Veränderung in der Verteilung der Hexokinaseaktivität zwischen der gelösten und der mitochondriellen Form führte. Im Gehirn der Ratten, die sich in der Thiopental-Narkose befanden, kam es bei einer unveränderten Hexokinaseaktivität im Rohhomogenat zu einer deutlichen Aktivitätszunahme der freien gelösten Enzymform (Tabelle 9). Ähnliche Veränderungen waren auch bei anderen Thiopentaldosen zu sehen (Tabelle 10). Es konnte gezeigt werden, daß eine statistisch signifikante, wenn auch nicht sehr ausgeprägte Korrelation zwischen dem Effekt und der Narkotikumdosis besteht (Abbildung 5).

Bei einer Thiopentaldosis von 20 mg/kg i. p. waren die Versuchstiere noch wach, nach der Gabe von 40 mg/kg i. p. waren sie nicht narkotisiert, jedoch schon deutlich benommen. Nach einer Injektion von 80 und 120 mg/kg i. p. befanden sich die Tiere in einer tiefen Narkose. Zeichen der respiratorischen Lähmung zeigten sich gelegentlich nach 160 mg/kg Thiopental i. p..

Tabelle 9: Einfluß von Thiopental auf die Verteilung der Hexokinaseaktivität zwischen der gelösten und der mitochondrialen Enzymform im Rattenhirn in vivo

	Rohhomogenat-Hexokinase	Aktivität (U/g)	
		gelöste Hexokinase	mitochondrielle Hexokinase
Kontrollen	9,36 $\pm$ 0,39	2,06 $\pm$ 0,08	7,31 $\pm$ 0,37
Thiopental	10,27 $\pm$ 0,32	2,97 $\pm$ 0,07 +	7,29 $\pm$ 0,29

Thiopental 120 mg/kg wurde i. p. injiziert, die Kontrolltiere bekamen 0,9 % Kochsalzlösung i. p. . Die Aufarbeitungsbedingungen sind im Kapitel Methodik unter 2.3. und 2.3.2. angegeben. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ in U/g Gehirn (Feuchtgewicht) angegeben. Die Aktivität der mitochondrialen Hexokinase wurde als Differenz aus der Aktivität der Rohhomogenat-Hexokinase und der gelösten Hexokinase ermittelt. U = 1 Einheit des Enzyms, angegeben als 1 μ Mol NADPH/min. Anzahl der Versuche n = 7. Die Thiopentaleffekte wurden mit dem t-Test nach Student geprüft. Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber Kontrollen: + p < 0,01.

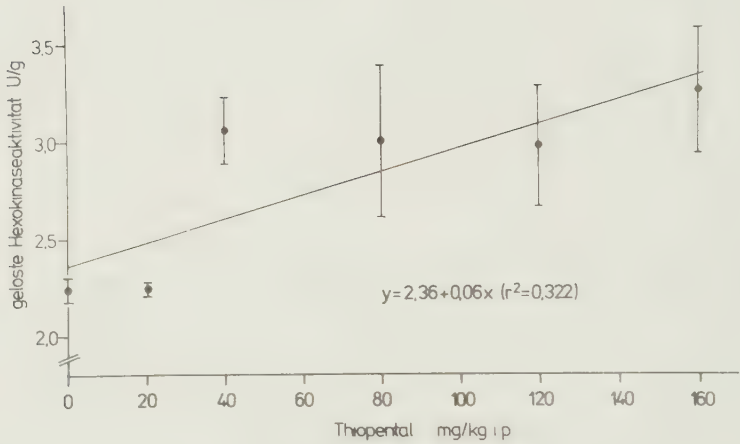
Tabelle 10: Einfluß von verschiedenen Thiopentaldosen auf die intrazelluläre Aktivitätsverteilung der Hexokinase im Rattenhirn

	Rohhomogenat-Hexokinase	Aktivität (U/g)	
		gelöste Hexokinase	mitochondrielle Hexokinase
Kontrollgruppe I n = 5	11,18 ± 0,03	2,28 ± 0,03	8,90 ± 0,05
Thiopental 20 mg/kg n = 5	11,16 ± 0,16	2,25 ± 0,03	8,91 ± 0,18
Kontrollgruppe II n = 6	10,17 ± 0,60	2,21 ± 0,12	7,95 ± 0,48
Thiopental 40 mg/kg n = 6	9,82 ± 0,27	3,06 ± 0,17 ++	6,76 ± 0,17 +
80 mg/kg n = 6	10,70 ± 0,52	3,00 ± 0,39 ++	7,70 ± 0,20
120 mg/kg n = 6	9,47 ± 0,33	2,97 ± 0,31 +	6,50 ± 0,32 +
160 mg/kg	10,40 ± 0,43	3,25 ± 0,32 ++	7,15 ± 0,15

Thiopental wurde i. p. appliziert, den Kontrollratten wurde physiologische Kochsalzlösung i. p. injiziert. Zustand der Versuchstiere: 20 mg/kg-Tiere wach, leichte Sedierung, 40 mg/kg-Tiere deutlich benommen, 80 und 120 mg/kg-tiefe Narkose, 160 mg/kg- tiefe Narkose, gelegentlich Zeichen der respiratorischen Lähmung.

Die Aufarbeitung erfolgte wie im Kapitel Methodik unter 2.3. und 2.3.2. angegeben. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ in U/g Gehirn (Feuchtgewicht) angegeben. Die Aktivität der mitochondrialen Hexokinase wurde als Differenz aus der Aktivität der Rohhomogenat-Hexokinase und der gelösten Hexokinase errechnet. U = 1 Einheit des Enzyms als $\mu\text{Mol NADPH/min}$. Die Thiopentaleffekte wurden mit dem t-Test nach Student geprüft. Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber den Kontrollen: + p < 0,05, ++ p < 0,01. n = Anzahl der Versuche.

Abbildung 5: Zunahme der gelösten Hexokinaseaktivität im Rattenhirn in Abhängigkeit von der Thiopentaldosis



Thiopental wurde i. p. appliziert, den Kontrolltieren wurde physiologische Kochsalzlösung i. p. injiziert.

Versuchsbedingungen wie in Tabelle 10 angegeben.

Der Korrelationskoeffizient (r) ist statistisch signifikant verschieden von Null; $p < 0,01$.

3.3.3. Einfluß von Thiopental auf die mitochondrielle Rattenhirnhexokinase in vitro

Die Inkubation der mitochondriellen Gehirnhomogenatfraktion mit Thiopental in einer Konzentration von 1 mM führte jeweils zu einer sehr deutlichen Aktivitätszunahme der gelösten Hexokinaseform in der Inkubationssuspension (Tabelle 11). Die in den einzelnen Experimenten mit Thiopental im Inkubationsansatz gemessene Aktivität der gelösten Hexokinase betrug 140 bis 247 % des Kontrollwertes.

Die Verdrängung der Hexokinase aus dem an Mitochondrien gebundenen Zustand durch Thiopental war dosisabhängig (Abbildung 6). In der Inkubationssuspension konnte bereits bei der relativ geringen Narkotikumkonzentration von 0,1 mM eine Zunahme der gelösten Hexokinaseaktivität nachgewiesen werden. Mit einer Steigerung der Thiopentalkonzentration bis 1 mM wurde der Effekt immer deutlicher. Der Anstieg der gelösten Enzymform war direkt proportional zu der Narkotikumdosis (Abbildung 6).

3.3.4. Einfluß von 6-Aminonicotinsäureamid auf die Thiopentaleffekte in vivo und in vitro

Wie aus Tabelle 12 hervorgeht, vermag 6-Aminonicotinsäureamid (35 mg/kg i.p.) 17 Stunden nach der Applikation das Aktivitätsgleichgewicht der cerebralen Hexokinase im gleichen Sinne wie Thiopental (100 mg/kg i.p.) zu beeinflussen. Der Anteil der gelösten Hexokinaseaktivität stieg nach der Behandlung mit dem Antimetaboliten an, die Aktivität der mitochondriellen Enzymform nahm ab.

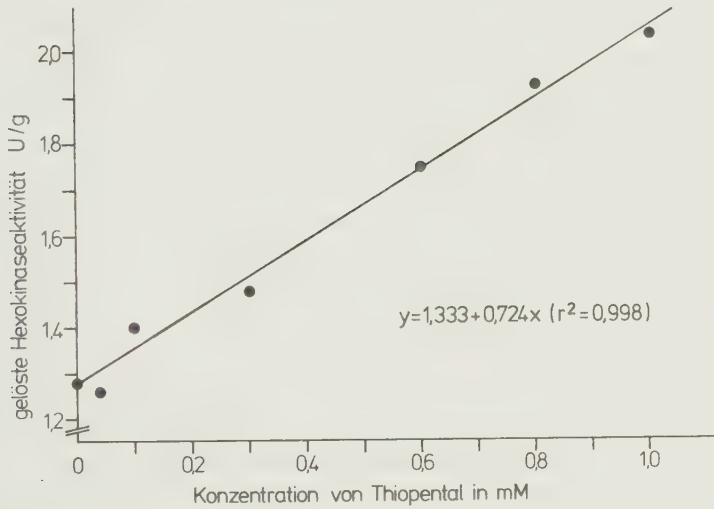
In Versuchen, in denen 17 Stunden nach der Vorbehandlung mit 6-Aminonicotinsäureamid (35 mg/kg i.p.) den Ratten Thiopental (100 mg/kg i.p.) appliziert wurde, schienen die Effekte qualitativ und quantitativ denen nach der alleinigen Gabe von Thiopental oder 6-Aminonicotinsäureamid ähnlich zu sein (Tabelle 12); sowohl die Zunahme der gelösten Hexokinaseaktivität als auch die Abnahme der mitochondriellen Enzymaktivität waren in der gleichen

Tabelle 11: Zunahme der gelösten Hexokinaseaktivität nach der Inkubation der mitochondriellen Fraktion aus Rattenhirn mit Thiopental

Ratten- hirn	<u>Aktivität der gelösten Hexokinase (U/g)</u>		% des Kontroll- wertes
	Kontrolle	Thiopental	
1	0,64	1,49	233
2	0,66	1,13	171
3	0,73	1,18	160
4	0,86	1,20	140
5	0,55	1,36	247
6	0,72	1,15	160

Das Gehirngewebe wurde wie unter 2.3. und 2.3.3. beschrieben aufgearbeitet. Das mit einem aliquoten Teil der mitochondriellen Fraktion mitinkubierte Thiopental (1 mM) wurde in 0,25 M Saccharoselösung gelöst. In den Kontrollversuchen wurde nur 0,25 M Saccharoselösung mitinkubiert. Gemessen wurde die Zunahme der gelösten Hexokinaseaktivität in der Inkubationssuspension. Die Werte sind in U/g Gewebe angegeben. U = 1 Einheit des Enzyms als 1 μ Mol NADPH/min. In den einzelnen Versuchspaaren (Kontrolle + Thiopental) wurden die Experimente mit der mitochondriellen Fraktion aus demselben Rattenhirn durchgeführt. Die durch die Inkubation zustande kommende Zunahme der gelösten Hexokinaseaktivität in der Inkubationssuspension wurde bei der Berechnung berücksichtigt.

Abbildung 6: Zunahme der gelösten Hexokinaseaktivität nach der Inkubation der mitochondriellen Fraktion aus Rattenhirn mit verschiedenen Thiopentalkonzentrationen in vitro



Das Gehirn einer unbehandelten Ratte wurde wie im Kapitel Methodik unter 2.3. und 2.3.3. angegeben aufgearbeitet. Thiopental wurde in 0,25 M. Saccharoselösung gelöst. Im Kontrollversuch wurde nur 0,25 M Saccharoselösung mitinkubiert. Danach wurde die Zunahme der gelösten Hexokinaseaktivität in der Inkubationssuspension gemessen. U = 1 Einheit des Enzyms als 1 μMol NADPH/min. r = Korrelationskoeffizient.

Tabelle 12: Einfluß von 6-Aminonicotinsäureamid und/oder Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität

	Rohhomogenat- Hexokinase	Aktivität (U/g) gelöste Hexokinase	mitochondrielle Hexokinase
Kontrolle n = 9	10,15 ± 0,17	2,01 ± 0,06	8,15 ± 0,19
Thiopental n = 8	9,97 ± 0,16	2,65 ± 0,09 ++	7,32 ± 0,21 +
6-Aminonico- tinsäureamid n = 9	9,66 ± 0,20	2,56 ± 0,11 ++	7,10 ± 0,25 ++
6-Aminonico- tinsäureamid + Thiopental n = 9	9,86 ± 0,22	2,77 ± 0,11 ++	7,09 ± 0,28 ++

17 Stunden nach der 6-Aminonicotinsäureamid- bzw. 30 Minuten nach der Thiopental-Applikation wurden die Tiere getötet und, wie unter 2.3. und 2.3.2. beschrieben, aufgearbeitet. Die Dosis des Antimetaboliten betrug 36 mg/kg i. p., die von Thiopental 100 mg/kg i. p.. In den Experimenten, in denen beiden Substanzen gegeben wurden, bekamen die Ratten zuerst 6-Aminonicotinsäureamid (35 mg/kg i. p.). 17 Stunden danach wurden sie mit Thiopental behandelt (100 mg/kg i. p.) und 30 Minuten nach der Thiopentalapplikation getötet. Den Kontrolltieren wurde 0,9 % Kochsalzlösung i. p. injiziert. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ in $\mu\text{g/g}$ Gehirngewebe (Feuchtgewicht) angegeben. Die Aktivität der mitochondrialen Hexokinase wurde als Differenz aus der Aktivität der Rohhomogenat-Hexokinase und der gelösten Hexokinase ermittelt. U = 1 Einheit des Enzyms als 1 $\mu\text{Mol NADPH/min}$. Die statistisch signifikanten Veränderungen gegenüber der Kontrollreihe (t-Test nach Student): + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$. n = Anzahl der Experimente.

Größenordnung wie in der Thiopental-Narkose bzw. wie nach der Applikation des Antimetaboliten allein.

Die Inkubation der Fraktion, die die mitochondrielle Hexokinase enthielt, mit 6-Aminonicotinsäureamid (1 mM) führte aber, im Gegensatz zu der Inkubation mit Thiopental (1 mM), zu keiner Aktivitätszunahme der gelösten Enzymform in der Inkubationssuspension (Tabelle 13). Der Antimetabolit zeigte auch keinen Einfluß auf die Verdrängungseffekte von Thiopental; die Aktivitätszunahme der gelösten Hexokinaseaktivität in der Inkubationssuspension, die sowohl 6-Aminonicotinsäureamid (1 mM) als auch Thiopental (1 mM) enthielt, war identisch mit der Aktivitätszunahme nach der Inkubation mit Thiopental allein (Tabelle 13).

Tabelle 13: Einfluß von 6-Aminonicotinsäureamid und/oder Thiopental auf die mitochondrielle Rattenhirnhexokinase in vitro

	Aktivität der gelösten Hexokinase			
	in U/g		in % des Kontrollwertes	
	a	b	a	b
Kontrolle	1,20	1,19		
Thiopental	2,02	2,00	168	168
6-Aminonicotinsäureamid	1,19	1,19	99	100
Thiopental + 6-Aminonicotinsäureamid	2,02	2,00	168	168

6-Aminonicotinsäureamid und Thiopental wurden in 0,25 M Saccharoselösung gelöst und in einer Konzentration von jeweils 1 mM mit der mitochondriellen Rattenhirnfraktion inkubiert (Fraktionierungs- und Inkubationsbedingungen wie unter 2.3. und 2.3.3. angegeben). In den Kontrollversuchen wurde ein aliquoter Teil der 0,25 M Saccharoselösung mitinkubiert. Gemessen wurde die Zunahme der gelösten Hexokinaseaktivität in der Inkubationssuspension. Es wurden die Einzelwerte aus zwei Versuchen (a, b) angegeben.

U = 1 Einheit des Enzyms als 1 μ Mol NADPH/min.

3.4. Einfluß von anderen Narkotika auf die Rattenhirnhexokinase

3.4.1. Einfluß von Narkotika auf die Aktivitätsverteilung der cerebralen Hexokinase in vivo

Alle untersuchten Narkotika, also Phenobarbital (250 mg/kg i.p.), Hexobarbital (200 mg/kg i.p.), Chloralhydrat (350 mg/kg i.p.), Ketamin (150 mg/kg i.p.), Urethan (1,2 g/kg i.p.), Äther und Halothan, führten zu einer ähnlichen Veränderung der cerebralen Aktivitätsverteilung der Hexokinase, wie sie nach Thiopental beobachtet wurde (Tabelle 14). In der Narkose war nach jedem dieser Pharmaka eine auffallende Aktivitätszunahme der gelösten Hexokinase zu beobachten. Die Aktivität der mitochondriellen Hexokinase schien dagegen abzunehmen, signifikant erniedrigt war sie nach der Urethan- und Phenobarbitalbehandlung.

3.4.2. Einfluß von Narkotika auf die mitochondrielle Hexokinase in vitro

Die Inkubation der mitochondriellen Hexokinasefraktion mit Phenobarbital, Hexobarbital, Chloralhydrat und Urethan - alle Pharmaka in einer Konzentration von 1 mM - führte zu einer Zunahme der gelösten Hexokinaseaktivität in der inkubierten Suspension (Tabelle 15). Eine Ausnahme bildete Ketamin; mit diesem Narkotikum war der Anstieg der gelösten Hexokinaseaktivität in vitro nicht nachzuweisen. Die Zunahme der gelösten Enzymform in der Inkubations-suspension war mit den untersuchten Narkotika nicht so groß wie mit Thiopental in äquimolarer Konzentration (siehe Tabelle 11). Am deutlichsten war sie mit Phenobarbital zu beobachten. Der Anstieg der gelösten Hexokinaseaktivität nach Hexobarbital, Chloralhydrat und Urethan war etwa gleich hoch und nicht mehr so stark ausgeprägt.

Tabelle 14: Einfluß von Narkotika auf die intrazelluläre Aktivitätsverteilung der cerebralen Hexokinase

Pharmakon	Rohhomogenat-Hexokinase	Aktivität (U/g)	
		gelöste Hexokinase	mitochondrielle Hexokinase
Phenobarbital 250 mg/kg n = 6	8,85 $\pm$ 0,10	2,74 $\pm$ 0,07 ++	6,10 $\pm$ 0,06 +
Kontrollen n = 6	8,93 $\pm$ 0,24	2,02 $\pm$ 0,06	6,91 $\pm$ 0,27
Hexobarbital 200 mg/kg n = 8	10,10 $\pm$ 0,26	2,67 $\pm$ 0,10 ++	7,43 $\pm$ 0,30
Kontrollen n = 9	9,87 $\pm$ 0,17	2,13 $\pm$ 0,05	7,73 $\pm$ 0,19
Chloralhydrat 350 mg/kg n = 7	9,24 $\pm$ 0,31	2,93 $\pm$ 0,12 ++	6,31 $\pm$ 0,27
Kontrollen n = 6	9,23 $\pm$ 0,15	2,23 $\pm$ 0,06	7,01 $\pm$ 0,17
Ketamin 150 mg/kg n = 7	10,32 $\pm$ 0,21	3,02 $\pm$ 0,09 ++	7,30 $\pm$ 0,13
Kontrollen n = 6	10,13 $\pm$ 0,29	2,44 $\pm$ 0,08	7,70 $\pm$ 0,25
Urethan 1,2 g/kg n = 12	10,62 $\pm$ 0,20	3,24 $\pm$ 0,03 ++	7,38 $\pm$ 0,21 +
Kontrollen n = 12	10,61 $\pm$ 0,15	2,62 $\pm$ 0,24	7,99 $\pm$ 0,20
Äther n = 8	10,16 $\pm$ 0,15	2,81 $\pm$ 0,09 ++	7,36 $\pm$ 0,19
Kontrollen n = 8	9,94 $\pm$ 0,25	2,22 $\pm$ 0,03	7,71 $\pm$ 0,26
Halothan n = 7	10,46 $\pm$ 0,27	2,93 $\pm$ 0,08 ++	7,53 $\pm$ 0,28
Kontrollen n = 7	10,31 $\pm$ 0,03	2,18 $\pm$ 0,09	8,13 $\pm$ 0,31

Fortsetzung der Tabelle auf Seite 58

Fortsetzung Tabelle 14:

Mit Äther und Halothan wurde eine Inhalationsnarkose durchgeführt, alle anderen Narkotika wurden den Ratten i. p. appliziert. Die Kontrolltiere bekamen 0,9 % Kochsalzlösung i. p., in Versuchen mit Äther und Halothan blieben sie ganz unbehandelt. Die Narkosedauer betrug nach Äther und Halothan 20 Minuten, nach allen anderen Narkotika 30 Minuten. Die Aufarbeitungsbedingungen sind unter 2.3. und 2.3.2. beschrieben. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ in U/g Gehirn (Feuchtgewicht) angegeben. Die Aktivität der mitochondriellen Hexokinase wurde als Differenz aus der Aktivität der Rohhomogenat-Hexokinase und der gelösten Hexokinase ermittelt. U = 1 Einheit des Enzyms, angegeben als 1 μ Mol NADPH/min. Die Signifikanz der Veränderungen nach den Narkotika wurde mit dem t-Test nach Student geprüft. Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber den Kontrollen: + p < 0,05, ++ p < 0,01.

Tabelle 15: Einfluß von Narkotika auf die mitochondrielle Rattenhirnhexokinase in vitro

Pharmakon	<u>Aktivität der gelösten Hexokinase</u>			
	in U/g		in % des Kontrollwertes	
	a	b	a	b
Kontrolle	1,18	1,18		
Phenobarbital	1,55	1,53	131	130
Hexobarbital	1,33	1,36	113	115
Chloralhydrat	1,38	1,39	117	117
Ketamin	1,18	1,18	100	100
Urethan	1,43	1,44	121	122

Das Gehirn einer unbehandelten Ratte wurde aufgearbeitet wie unter 2.3. und 2.3.3. beschrieben. Die mit einem aliquoten Teil der mitochondriellen Fraktion mitinkubierten Narkotika wurden in 0,25 M Saccharoselösung gelöst. Ihre Konzentration in der Inkubationssuspension betrug 1 mM. In den Kontrollversuchen wurde nur 0,25 M Saccharoselösung mitinkubiert. Gemessen wurde die Zunahme der gelösten Hexokinaseaktivität in der Inkubationssuspension. Die einzelnen Werte aus 2 Experimenten (a, b) sind in U/g Gehirn angegeben. U = 1 Einheit des Enzyms als 1 μ Mol NADPH pro min.

3. 4. 3. Einfluß von Barbituraten auf die mitochondrielle Hexokinase in vitro
- Abhängigkeit der Effekte von der Lipophilie der Pharmaka -

Die Verteilungskoeffizienten für Thiopental, Amobarbital, Pentobarbital, Hexobarbital und Barbital und die Wirkung dieser Pharmaka auf die mitochondrielle Hexokinasefraktion wurden in Tabelle 16 zusammengestellt. Die Koeffizienten gelten für das Wasser-Oktanol-System (LEO et al., 1971). In Experimenten, in denen isolierte, mitochondrielle Hexokinase, resuspendiert in der 10fachen Menge 0,25 M Saccharoselösung + 0,02 M Hepes-Puffer pH 7,5, mit Barbituraten in einer Konzentration von jeweils 1 mM inkubiert wurde, zeigte sich, außer mit Pentobarbital, mit allen untersuchten Pharmaka eine Zunahme der gelösten Enzymform in der Inkubationssuspension (Tabelle 16 a). Am höchsten schien sie mit Thiopental zu sein, nach der Inkubation mit anderen Barbituraten war sie deutlich niedriger und schien sich von Pharmakon zu Pharmakon nicht deutlich zu unterscheiden. Auch nach einer weiteren Verdünnung der die mitochondrielle Hexokinase enthaltenden Fraktion - sie wurde in der 20fachen Menge 0,25 M Saccharoselösung + 0,02 M Hepes-Puffer pH 7,5 resuspendiert - konnte keine bessere Auflösung der einzelnen Barbiturateffekte erzielt werden (Tabelle 16 b). Die Zunahme der gelösten Hexokinaseaktivität in der Inkubationssuspension war mit Thiopental auch in diesen Versuchen am höchsten. Die Verdrängungseffekte durch andere Barbiturate waren viel schwächer und mit Ausnahme von Pentobarbital, das gar keine Wirkung zu haben schien, bei allen untersuchten Substanzen ähnlich stark ausgeprägt.

Unter gegebenen Bedingungen konnte also keine eindeutige Abhängigkeit zwischen den Effekten der Barbiturate auf die mitochondrielle Hexokinase und der Lipophilie dieser Pharmaka gezeigt werden.

Tabelle 16:

Zunahme der gelösten Hexokinaseaktivität nach der Inkubation der mitochondrialen Fraktion aus Rattenhirn mit Barbituraten. Abhängigkeit des Effektes von der Lipophilie der Pharmaka

Aktivität der gelösten Hexokinase

	Verteilungskoeffizient $H_2O/Octanol$ (LEO^2 et al., 1971)	in U/g		in % des Kontrollwertes	
		a	b	a	b
Kontrolle		1,28	1,29	1,34	
Thiopental	676	2,26	2,27	2,36	2,37
Amobarbital	117	1,46	1,47	1,48	1,46
Pentobarbital	107	1,29	1,27	1,38	1,36
Hexobarbital	31	1,45	1,46	1,61	1,67
Phenobarbital	26	1,72	1,78	1,77	1,70
Barbital	5	1,52	1,47	1,58	1,61

Das Gehirn einer unbehandelten Ratte wurde wie unter 2.3. und 2.3.3. angegeben aufgearbeitet. Die mit der mitochondrialen Fraktion inkubierten Barbiturate wurden in 0,25 M Saccharoselösung gelöst. In den Kontrollversuchen wurde nur 0,25 M Saccharoselösung mitinkubiert. Die Pharmakonzentration in der Inkubations Suspension betrug 1 mM. Gemessen wurde die Zunahme der gelösten Hexokinaseaktivität in der Inkubations Suspension. Es wurden die Doppelwerte aus zwei Experimenten: a (mitochondrielle Hexokinase resuspendiert in der 10fachen Menge 0,25 M Saccharoselösung + 0,02 M Hepes Puffer pH 7,5) und b (mitochondrielle Hexokinase resuspendiert in der 20fachen Menge 0,25 M Saccharoselösung + 0,02 M Hepes Puffer pH 7,5) angegeben. U = 1 Einheit des Enzyms als 1 μ Mol NADPH/min.

3. 5. Korrelation der Narkotikaeffekte auf die Aktivitätsverteilung der cerebralen Hexokinase mit dem Narkosezustand

3. 5. 1. Versuche mit Thiopental

Die Veränderungen in der Verteilung der Hexokinaseaktivität zwischen der gelösten und der mitochondriellen Enzymform bildeten sich mit dem Aufwachen der Tiere aus der Thiopental-Narkose (80 mg/kg i. p.) zurück (Tabelle 17, Abbildung 7). Bei einer tiefen Narkose, 30 Minuten nach der Pharmakonapplikation, kam es zu einer deutlichen Zunahme der gelösten Hexokinaseaktivität im Gehirn (Abbildung 7). 5 Stunden nach der Thiopentalinjektion wachten die Tiere aus der Narkose auf; sie wirkten noch deutlich benommen, die Stellreflexe waren aber schon vorhanden. In dieser Phase konnten keine signifikanten Veränderungen mehr nachgewiesen werden (Tabelle 17, Abbildung 7), obwohl die Aktivität der gelösten Hexokinase im Vergleich zu dem in der Narkose gemessenen Wert sogar abzunehmen schien (Abbildung 7). 17 Stunden nach der Thiopentalgabe entsprach die Aktivitätsverteilung der cerebralen Hexokinase der in den Kontrollversuchen (Tabelle 17, Abbildung 7). Die Tiere waren zu dieser Zeit vollkommen wach.

3. 5. 2. Versuche mit Halothan

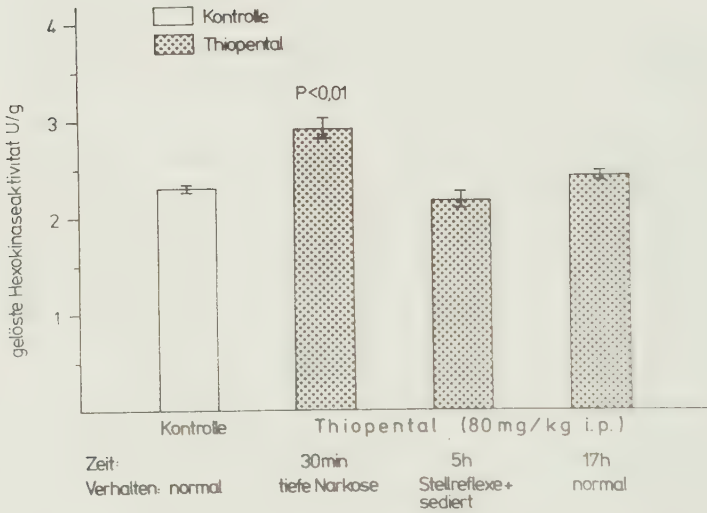
Eine deutliche Zunahme der Aktivität der gelösten Hexokinase war nach Halothan gleichzeitig mit dem Narkoseeintritt, also nach ca. 2 Minuten Narkotikuminhalation, nachzuweisen (Abbildung 8). Zu dieser Zeit zeigten die Tiere auch keine Stellreflexe mehr. Nach einer 10 Minuten dauernden Halothan-Narkose waren dieselben Effekte weiterhin zu beobachten. Die gelöste Hexokinaseaktivität war den Kontrollwerten gegenüber stark erhöht, die mitochondrielle Hexokinaseaktivität nahm signifikant ab (Tabelle 18, Abbildung 8). Im Vergleich zu den Werten, die gleich nach dem Narkoseeintritt gemessen wurden, schienen sich die Effekte nach 10 Minuten Narkosedauer leicht zu vertiefen. Bei den Tieren, die nach einer 10 Minuten anhaltenden Narkose

Tabelle 17: Korrelation der Thiopentaleffekte auf die cerebrale Aktivitätsverteilung der Hexokinase mit dem Narkosezustand

	Aktivität (U/g)		
	Rohhomogenat-Hexokinase	gelöste Hexokinase	mitochondrielle Hexokinase
Kontrollen n = 8	9,16 ± 0,33	2,30 ± 0,04	6,85 ± 0,31
Zeit zwischen der Thiopental- gabe und der Dekapitation:			
30 Minuten n = 6	8,86 ± 0,35	2,91 ± 0,11 +	5,73 ± 0,39
5 Stunden n = 6	9,55 ± 0,25	2,17 ± 0,09	7,38 ± 0,19
17 Stunden n = 9	9,14 ± 0,94	2,41 ± 0,05	6,73 ± 0,34

Thiopental (80 mg/kg) wurde i. p. injiziert. Die Kontrollratten bekamen 0,9 % Kochsalzlösung i. p. . Die Aufarbeitung erfolgte wie unter 2.3. und 2.3.2. beschrieben. 30 Minuten nach der Thiopentalapplikation befanden sich die Tiere in einer tiefen Narkose, 5 Stunden nach der Pharmakoninjektion waren sie noch leicht benommen, 17 Stunden nach der Thiopentalgabe verhielten sie sich wieder normal. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ in U/g Gehirngewebe (Feuchtgewicht) angegeben. Die Aktivität der mitochondriellen Hexokinase wurde als Differenz aus der Aktivität der Rohhomogenat-Hexokinase und der gelösten Hexokinase errechnet. n = Anzahl der Versuche. U = 1 Einheit des Enzyms als 1 μ Mol NADPH/min. Die Effekte wurden mit dem t-Test nach Student geprüft. Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber den Kontrollen: + p < 0,01.

Abbildung 7: Narkose und die cerebrale Aktivitätsverteilung der Hexokinase



Thiopental (80 mg/kg) wurde i. p. appliziert, die Kontrolltiere bekamen 0,9 % Kochsalzlösung.

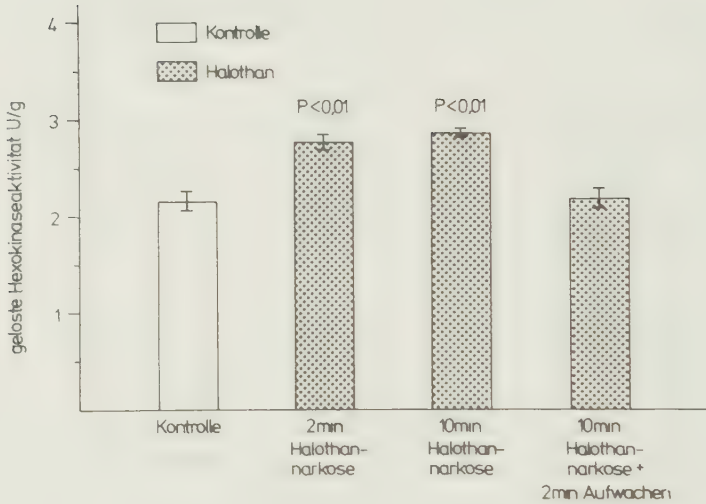
Die Säulen stellen Mittelwerte dar. Streuungsangaben sind als mittlerer Fehler des Mittelwertes angegeben. Signifikante Veränderungen gegenüber den Kontrollen (Student t-Test) sind über den Säulen angegeben. Die Versuchsbedingungen und die Anzahl der Experimente wurden in Tabelle 17 angegeben.

Tabelle 18: Korrelation der Halothaneffekte auf die cerebrale Aktivitätsverteilung der Hexokinase mit dem Narkosezustand

	Rohhomogenat-Hexokinase	Aktivität (U/g)	
		gelöste Hexokinase	mitochondrielle Hexokinase
Kontrollen	8,93 $\pm$ 0,18	2,16 $\pm$ 0,10	6,77 $\pm$ 0,10
Halothan:			
2 Minuten Halothaninhalation (Stellreflex: -)	9,09 $\pm$ 0,27	2,77 $\pm$ 0,08 ++	6,32 $\pm$ 0,29
10 Minuten Narkosedauer (tiefe Narkose)	8,97 $\pm$ 0,29	2,86 $\pm$ 0,05 ++	6,11 $\pm$ 0,26 +
2 Minuten nach Beenden einer 10 Minuten dauernden Halothannarkose (Stellreflex: +)	9,23 $\pm$ 0,44	2,18 $\pm$ 0,12	7,05 $\pm$ 0,41

Es wurde eine Inhalationsnarkose mit Halothan durchgeführt. Die Kontrolltiere blieben unbehandelt. Die Aufarbeitung erfolgte wie unter 2.3. und 2.3.2. angegeben. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ in U/g Gehirngewebe (Feuchtgewicht) angegeben. Die Aktivität der mitochondrialen Hexokinase wurde als Differenz aus der Aktivität der Rohhomogenat-Hexokinase und der gelösten Hexokinase ermittelt. U = 1 Einheit des Enzyms als 1 μ Mol NADPH/min. Die Effekte wurden mit dem t-Test nach Student geprüft. Statistisch signifikante Veränderungen zu den Kontrollversuchen: + p < 0,05, ++ p < 0,01. Die Anzahl der Experimente betrug jeweils 6.

Abbildung 8: Narkose und die cerebrale Aktivitätsverteilung der Hexokinase



Versuchsbedingungen wie in Tabelle 18 angegeben.

Die Säulen stellen Mittelwerte dar. Streuungsangaben sind als mittlerer Fehler des Mittelwertes angegeben. Signifikante Veränderungen gegenüber den Kontrollen (Student t-Test) wurden über den Säulen angegeben. Anzahl der Versuche $n = 6$.

aufwachten (Stellreflexe wieder vorhanden), konnten keine Effekte mehr auf die cerebrale Aktivitätsverteilung der Hexokinase gezeigt werden (Tabelle 18, Abbildung 8).

3.5.3. Versuche mit Phenobarbital und Pentetrazol

In der Phenobarbital-Narkose (200 mg/kg i. p.) waren die für Narkotika typischen Veränderungen in der cerebralen Verteilung der Hexokinaseaktivität wieder nachzuweisen (Tabelle 19, Abbildung 9). Die Aktivität der gelösten Enzymform war erhöht, die der mitochondriellen Hexokinase nahm ab. Die Tiere, die nach 30 Minuten Phenobarbital-Narkose Pentetrazol (150 mg/kg i. p.) bekamen, waren bereits nach 4 bis 5 Minuten (Stellreflexe wieder vorhanden) wach und zeigten diese Veränderungen nicht mehr (Tabelle 19, Abbildung 9); alle Werte näherten sich denen der Kontrollversuche. Pentetrazol selbst (150 mg/kg i. p.) zeigte keine Effekte auf das cerebrale Aktivitätsgleichgewicht der Hexokinase. Die Verteilung der Enzymaktivität nach diesem Anästhetikum entsprach der in den Kontrollversuchen (Tabelle 19, Abbildung 9).

In vitro beeinflusste Pentetrazol (1 mM) die durch Phenobarbital (1 mM) verursachte Verschiebung der Hexokinaseaktivität zur gelösten Enzymform nicht (Tabelle 20). Die Zunahme der gelösten Hexokinaseaktivität in der Inkubationssuspension war in Experimenten mit Phenobarbital und Pentetrazol genauso hoch wie mit Phenobarbital allein. In Versuchen, in denen die mitochondrielle Homogenatfraktion nur mit Pentetrazol (1 mM) inkubiert wurde, war die Aktivitätszunahme der gelösten Hexokinase identisch mit der in den Kontrollversuchen.

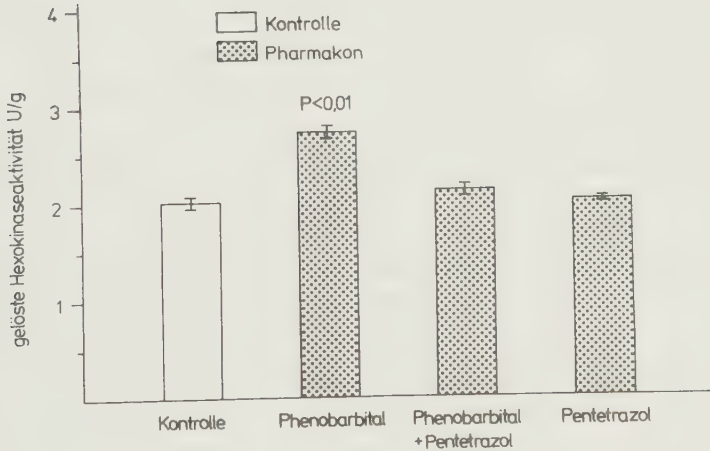
Tabelle 19: Einfluß von Phenobarbital und/oder Pentetrazol auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität im Rattenhirn

	Rohhomogenat-Hexokinase	Aktivität (U/g) gelöste Hexokinase	mitochondrielle Hexokinase
Kontrollen (a)	8,93 $\pm$ 0,24	2,02 $\pm$ 0,06	6,91 $\pm$ 0,27
Phenobarbital (b)	8,85 $\pm$ 0,10	2,74 $\pm$ 0,07 ++	6,10 $\pm$ 0,06 +
Phenobarbital + Pentetrazol (c)	9,70 $\pm$ 0,32	2,13 $\pm$ 0,06	7,57 $\pm$ 0,29
Pentetrazol (d)	9,26 $\pm$ 0,19	2,02 $\pm$ 0,03	7,24 $\pm$ 0,17

- (a) Die Kontrolltiere bekamen 0,9 % Kochsalzlösung i. p.,
 (b) 30 Minuten nach einer i. p. -Applikation von 200 mg/kg Phenobarbital,
 (c) 30 Minuten nach einer i. p. -Applikation von 200 mg/kg Phenobarbital wurden 150 mg/kg Pentetrazol i. p. injiziert. Nach ca. 4 Minuten waren die Tiere wach und wurden durch Genickschlag getötet,
 (d) mit Pentetrazol behandelte Tiere (150 mg/kg i. p.) wurden nach ca. 4 Minuten Einwirkungszeit des Analeptikums getötet.

Die Aufarbeitung erfolgte wie unter 2.3. und 2.3.2. angegeben. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_x$ in U/g Gehirn (Feuchtgewicht) angegeben. Die Aktivität der mitochondriellen Hexokinase wurde als Differenz aus der Aktivität der Rohhomogenat-Hexokinase und der gelösten Hexokinase errechnet. U = 1 Einheit des Enzyms als 1 μ Mol NADPH/min. Die Signifikanz der Veränderungen wurde mit dem t-Test nach Student geprüft: statistisch signifikante Veränderungen zu den Kontrollwerten: + p < 0,05, ++ p < 0,01. Anzahl der Versuche n = 6.

Abbildung 9: Korrelation zwischen dem Narkosezustand und der intrazellulären Aktivitätsverteilung der Rattenhirnhexokinase



Versuchsbedingungen wie in Tabelle 19 angegeben.

Die Säulen stellen Mittelwerte dar. Streuungsangaben sind als mittlerer Fehler des Mittelwertes angegeben. Signifikante Veränderungen gegenüber den Kontrollen wurden über den Säulen angezeichnet (Student-t-Test). Anzahl der Versuche $n = 6$.

Tabelle 20: Einfluß von Phenobarbital und/oder Pentetrazol auf die mitochondrielle Rattenhirnhexokinase in vitro

	Aktivität der gelösten Hexokinase			
	in U/g		in % des Kontrollwertes	
	a	b	a	b
Kontrolle	1,50	1,50		
Phenobarbital	2,03	2,04	135	136
Phenobarbital + Pentetrazol	2,04	2,02	136	135
Pentetrazol	1,50	1,50	100	100

Das Gehirn einer unbehandelten Ratte wurde aufgearbeitet, wie unter 2.3. und 2.3.3. beschrieben. Die mit der mitochondriellen Fraktion inkubierten Pharmaka wurden in 0,25 M Saccharoselösung gelöst. Ihre Konzentration in der Inkubationssuspension betrug jeweils 1 mM. In den Kontrollversuchen wurde nur 0,25 M Saccharoselösung mitinkubiert. In der inkubierten Suspension wurde die Aktivität der gelösten Hexokinase bestimmt. Es wurde eine Doppelbestimmung (a, b) durchgeführt.

3.6. Einfluß von Thiopental auf die cerebrale Phosphofructokinase und Pyruvatkinase

3.6.1. Einfluß von Thiopental auf die Aktivitätsverteilung der cerebralen Phosphofructokinase und Pyruvatkinase in vivo

Die Verteilung der Phosphofructokinase und der Pyruvatkinase (und zum Vergleich der Hexokinase) zwischen der mitochondriellen und der löslichen Fraktion des Rattenhirnhomogenats ist in Tabelle 21 dargestellt.

Der größte Teil der Aktivität der Phosphofructokinase (ca. 80 %) und der Pyruvatkinase (ca. 74 %) war in der gelösten Form zu finden. Nur ca. 20 % der Phosphofructokinase- und ca. 26 % der Pyruvatkinaseaktivität wurden in der mitochondriellen Fraktion nachgewiesen. Das Verteilungsmuster der Hexokinaseaktivität war geradezu umgekehrt. Ca. 77 % der Enzymaktivität waren auch diesmal in der mitochondriellen Fraktion des Rohhomogenats zu finden, 23 % machte die gelöste Enzymform aus (Tabelle 21 a).

Auch in diesen Experimenten konnte wieder gezeigt werden, daß Thiopental die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität zu verändern vermag, indem es den Anteil der gelösten Enzymform erhöht und den der mitochondriellen erniedrigt (Tabelle 21 b). Der Effekt war allerdings nicht so deutlich wie in früheren Experimenten mit Thiopental (sh. Tabelle 9), was wahrscheinlich auf die veränderten Aufarbeitungsbedingungen (z. B. zusätzliches Waschen der mitochondriellen Fraktion) zurückzuführen ist.

Das Verteilungsmuster der Phosphofructokinase- und der Pyruvatkinaseaktivität blieb in der Thiopental-Narkose unter den gegebenen Bedingungen unverändert (Tabelle 21 b).

Tabelle 21:

Einfluß von Thiopental auf die Aktivitätsverteilung der cerebralen Hexokinase, Phosphofructokinase und Pyruvatkinase

	gemessene Aktivität (U/g)		mitochondrielle		% der Gesamtkativität	
	Rohhomogenat	lösliche Fraktion	Fraktion	Fraktion	lösliche Fraktion	mitochondrielle Fraktion
(a) Kontrolle, n=2						
Hexokinase	8,08	7,88	1,83	1,87	6,25	6,22
Phosphofructokinase	7,26	6,99	7,32	7,16	2,00	1,81
Pyruvatkinase	18,45	18,44	17,27	17,16	6,11	6,15
					74	74
					23	23
					80	80
					21	21
					26	26
(b) Thiopental, n=2						
Hexokinase	7,89	8,04	2,33	2,23	6,04	6,00
Phosphofructokinase	6,93	7,18	7,13	7,51	1,81	1,81
Pyruvatkinase	18,20	18,44	17,18	17,16	6,11	6,11
					74	74
					27	27
					80	80
					20	20
					26	26

Die Tiere bekamen 100 mg/kg Thiopental i. p. . den Kontrollen wurde 0,9 % Kochsalzlösung injiziert. Nach 30 Minuten wurden die Ratten getötet. Die Aufarbeitung des Gehirngewebes wurde wie unter 2.4.1. beschrieben durchgeführt. Die Werte sind in U/g Gehirn (Feuchtgewicht) angegeben, der Anteil der gelösten und der mitochondrialen Enzymform wurde auch in % der ausgerechneten Gesamtkativität angegeben. U : 1 Einheit des Enzyms als 1 μ Mol NADPH bzw. NAD/min. n = Anzahl der Experimente.

3.6.2. Einfluß von Thiopental auf die Aktivität der cerebralen Phospho- fructokinase und Pyruvatkinase in vitro

Die Aktivität wurde im Rohhomogenat mit Thiopental in einer Konzentration von 0,3 mM geprüft. Die Kontrollversuche wurden ohne Thiopental durchgeführt. Das Pharmakon zeigte keinen Einfluß auf die Aktivität der Rattenhirn-pyruvatkinase (Tabelle 22); die Kinetik des Enzyms, gemessen unter verschiedenen Substratkonzentrationen (jeweils veränderte Konzentration von Phosphoenol-pyruvat bei einer konstanten Konzentration von ADP und umgekehrt), blieb mit Thiopental unbeeinflusst.

Die cerebrale Phosphofructokinase im Rohhomogenat schien dagegen durch Thiopental in derselben Konzentration (0,3 mM) kompetitiv zu Fructose-6-phosphat gehemmt zu werden (Abbildung 10). Eine schwache Hemmung deutete sich auch an, wenn bei einer konstant gehaltenen Konzentration von Fructose-6-phosphat die ADP-Konzentration verändert wurde (Abbildung 11).

Tabelle 22: Einfluß von Thiopental auf die Aktivität der cerebralen Pyruvatkinase in vitro

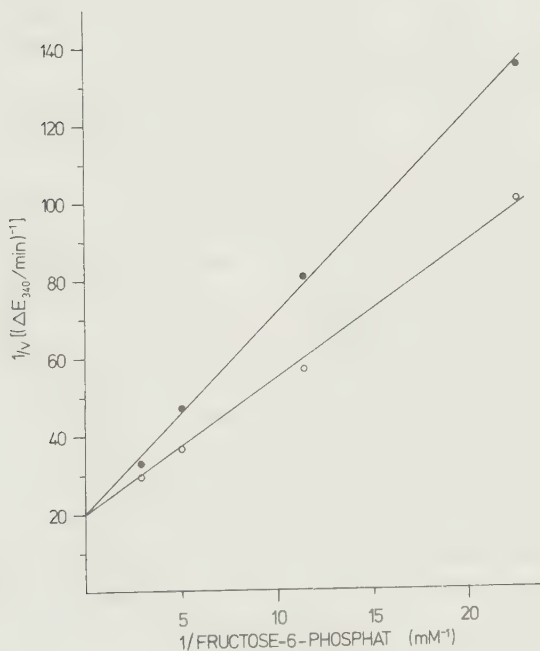
Thiopental	Phosphoenolpyruvat (mM)	ADP (mM)	Aktivität (U/g)
-	0,0500	0,23	20,37
+	0,0500	0,23	20,37
-	0,0250	0,23	13,42
+	0,0250	0,23	13,33
-	0,0125	0,23	10,03
+	0,0125	0,23	10,14
-	0,0050	0,23	5,03
+	0,0050	0,23	5,01
-	0,8	0,0560	9,58
+	0,8	0,0560	9,58
-	0,8	0,0280	5,59
+	0,8	0,0280	5,60
-	0,8	0,0140	3,38
+	0,8	0,0140	3,37
-	0,8	0,0028	0,96
+	0,8	0,0028	0,96

Das Gehirn einer unbehandelten Ratte wurde wie unter 2.4.2. beschrieben aufgearbeitet. Die angegebene Substratkonzentration bezieht sich auf die Substratmenge, die zugegeben wurde.

Die Thiopentalkonzentration im Meßansatz betrug 0,3 mM.

U = 1 Einheit des Enzyms als 1 μ Mol NAD/min.

Abbildung 10: Einfluß von Thiopental auf die Aktivität der cerebralen Phosphofructokinase

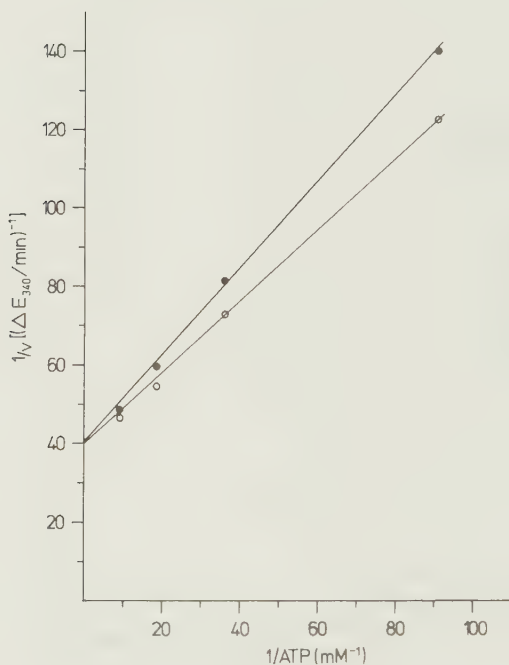


In einer Darstellung nach Lineweaver-Burk wurden die reziproken Werte der Reaktionsgeschwindigkeit (in Extinktionseinheiten) gegen die reziproken Werte der Fructose-6-phosphat-Konzentration aufgetragen. Die ATP-Konzentration war konstant und betrug 0,44 mM. Die Konzentration von Fructose-6-phosphat wurde von 0,350, 0,175, 0,088 bis 0,044 mM variiert. Die anderen Meßparameter wurden im Kapitel 2.4.3. angegeben.

Die Thiopentalkonzentration im Meßansatz betrug jeweils 0,3 mM.

○ Versuche ohne Thiopental; ● Versuche mit Thiopental

Abbildung 11: Einfluß von Thiopental auf die Aktivität der cerebralen Phosphofructokinase



Es wurden in einer Darstellung nach Lineweaver-Burk die reziproken Werte der Reaktionsgeschwindigkeit (in Extinktionseinheiten) gegen die reziproken Werte der ATP-Konzentration aufgetragen. Die Konzentration von Fructose-6-phosphat war konstant und betrug 7 mM. Die ATP-Konzentration wurde von 0,110, 0,055, 0,027 bis 0,011 variiert. Die anderen Meßparameter waren wie unter 2.4.3. angegeben. Die Thiopentalkonzentration im Meßansatz betrug 0,3 mM.

○ Versuche ohne Thiopental; ● Versuche mit Thiopental

4. DISKUSSION

In den ersten am isoliert perfundierten Rattenhirn mit 6-Aminonicotinsäureamid und Thiopental durchgeführten Experimenten sollte der Narkotikaeingriff in der Glykolyse näher untersucht werden.

Die in den Versuchen mit Thiopental beobachteten Veränderungen im Energiestoffwechsel des isoliert perfundierten Rattenhirns stimmen gut mit denen überein, die in der Literatur (HEIN et al., 1975; KRIEGLSTEIN und STOCK, 1975a) für dieses Pharmakon angegeben werden. Die beobachtete Erhöhung der Konzentration von Creatinphosphat und Glucose und die Abnahme der Lactatkonzentration im Gehirn (Tabelle 3, Abbildung 3) gehören aber auch zu den typischen Effekten der Narkotika allgemein (LOWRY et al., 1964; MAYMAN et al., 1964; SCHMAHL et al., 1965; GOLDBERG et al., 1966; GRANHOLM et al., 1968; NILSSON und SJESJÖ, 1970; BRUNNER et al., 1971; FINK und HASCHKE, 1973). Wichtig für die Relevanz der vorliegenden Befunde ist, daß die in den Experimenten eingesetzte Thiopentaldosis im therapeutischen Bereich lag. Es ist bekannt, daß toxische Narkotikakonzentrationen gerade umgekehrte Veränderungen im cerebralen Energiestoffwechsel hervorrufen als die, die in einer Narkose zustandekommen (LE PAGE, 1946; McILWAIN und BACHELARD, 1971; MICHENFELDER und THEYE, 1975). Die Narkotikumkonzentration im Perfusionsmedium (0,15 mM) stand im guten Einklang mit den Werten, die für die Thiopentalblutspiegel der sich in der Narkose befindenden Tiere und Menschen angegeben werden (BRODIE et al., 1950, 1952; BRAND et al., 1961). Auch die Veränderungen im Elektroencephalogramm (EEG) (Abbildung 4) waren typisch für eine Thiopental-Narkose (KIERSEY et al., 1951).

Wie schon von KRIEGLSTEIN und STOCK (1975b) gezeigt werden konnte, führt 6-Aminonicotinsäureamid im isoliert perfundierten Rattenhirn zu Veränderungen, die von Versuchen an Ratten und Mäusen in vivo bekannt sind (HERKEN und LANGE, 1969; HERKEN et al., 1969; LANGE et al., 1970; KELLER et al., 1972; KAUFFMAN und JOHNSON, 1974). Das wurde in den mit dem An-

timetaboliten durchgeführten Experimenten nochmals bestätigt. Nach einer Vorbehandlung der Versuchstiere mit 6-Aminonicotinsäureamid konnte im isoliert perfundierten Rattenhirn eine auffallend hohe Konzentration von 6-Phosphogluconat gemessen werden (Tabelle 4) - eine Folge der Aktivitätsbeeinträchtigung der cerebralen 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase durch 6-ANADP (6-Aminonicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat), das nach der Gabe dieses Pharmakons im Zentralnervensystem entsteht (HERKEN und LANGE, 1969). Das sich im Gehirn anhäufende 6-Phosphogluconat hemmt die cerebrale Glucose-6-phosphat-Isomerase (LANGE et al., 1970; KELLER et al., 1972). Der in Versuchen mit 6-Aminonicotinsäureamid beobachtete Anstieg der Glucose- und Glucose-6-phosphat-Konzentration (Abbildung 3) ist offenbar auf die Beeinträchtigung dieses Enzyms zurückzuführen. Diese Veränderungen, die mit einer Abnahme der cerebralen Lactatkonzentration (Tabelle 3) einhergehen, sprechen für eine Hemmung des glykolytischen Flusses (LANGE et al., 1970; KELLER et al., 1972; KAUFFMAN und JOHNSON, 1974; KRIEGLSTEIN und STOCK, 1975b). 6-Aminonicotinsäureamid zeigte auch einen Effekt auf den ATP-Spiegel im Gehirn (Tabelle 3). 17 Stunden nach der Applikation des Antimetaboliten nahm die Konzentration dieses energiereichen Substrates sehr deutlich ab. Ein ähnlicher Effekt wurde von KAUFFMAN und JOHNSON (1974) an Mäusen *in vivo* beobachtet. Da die ADP-, AMP- und der Creatinphosphat-Spiegel unverändert blieben (Tabelle 3), könnte der Befund als Folge der gestörten ATP-Synthese interpretiert werden. Unter *in vitro*-Bedingungen gelang es allerdings nicht, eine solche Störung durch 6-Aminonicotinsäureamid oder seine Metaboliten nachzuweisen (COPER und NEUBERT, 1964).

Als ein völlig neuer Aspekt der Wirkung von 6-Aminonicotinsäureamid erwies sich die in den Experimenten mit diesem Pharmakon gezeigte Abnahme der cerebralen Glutamatkonzentration (Tabelle 3). Der Effekt wurde in späteren, ergänzenden Untersuchungen *in vivo* näher geprüft.

Ein Einfluß des Antimetaboliten auf das EEG, wie er von HERTER et al. (1961) beschrieben wurde, konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 4). In den Experimenten am isoliert perfundierten Rattenhirn wurde allerdings

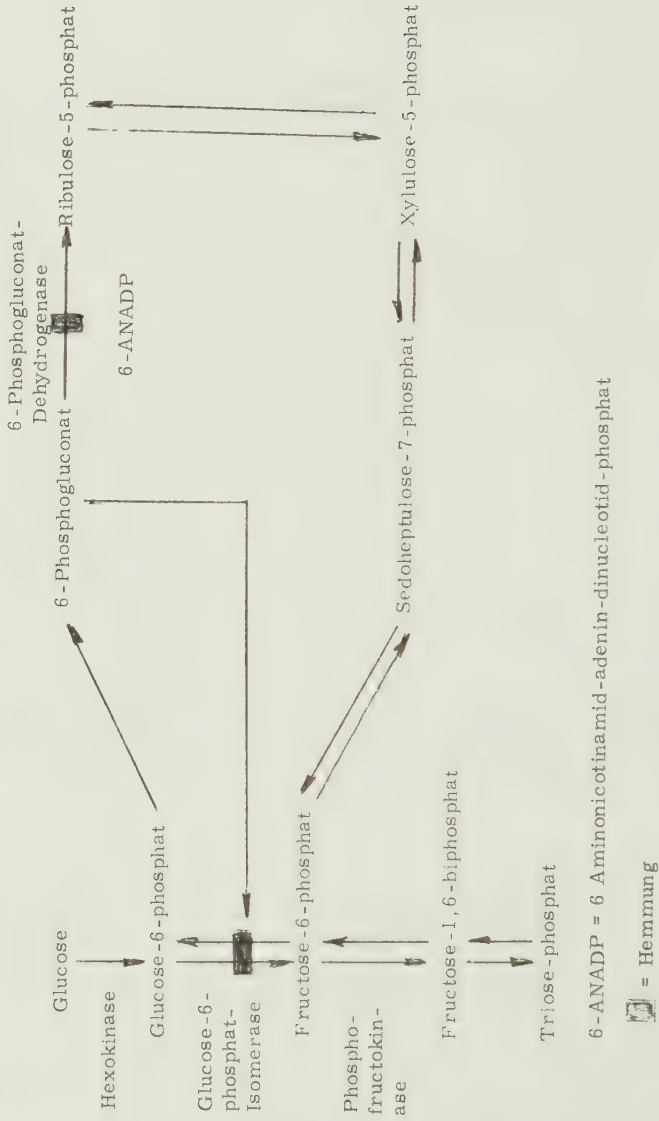
das Rückenmark, das unter 6-Aminonicotinsäureamid ähnlich wie das Gehirn in seiner Funktion stark gestört wird, entfernt und somit sein Einfluß auf das EEG eliminiert.

Das Einsetzen von 6-Aminonicotinsäureamid in Experimenten mit Thiopental führte auch zu keinen deutlichen Veränderungen in dem für eine Narkose charakteristischen EEG-Bild (Abbildung 4). REDETZKI und ALVAREZ-O'BOURKE (1962) und COPER et al. (1966) zeigten eine Verlängerung der pharmakologisch erzeugten Narkose bei Versuchstieren, denen der Antimetabolit appliziert wurde. Eine Aussage über einen Einfluß dieser Substanz auf die Thiopental-Narkose konnte aber an Hand des EEG-Bildes als Narkoseparameter in Versuchen an isoliert perfundierten Rattenhirnen nicht gemacht werden.

Sehr interessante Effekte zeigten sich im Energiestoffwechsel unter der Zusammenwirkung der beiden Substanzen. Gemeinsam schienen die beiden Pharmaka den Glucoseabbau in der Glykolyse noch effektiver zu drosseln, als wenn sie allein wirkten; in Versuchen, in denen sowohl 6-Aminonicotinsäureamid als auch Thiopental eingesetzt wurden, war der Anstieg der Glucosekonzentration und die Abnahme der Lactatkonzentration größer als in den Experimenten, die nur mit einer der beiden Substanzen durchgeführt wurden (Tabelle 3, Abbildung 3). Der Hexokinase- und der Phosphofructokinaseschritt, die als potentielle Narkotikaeingriffspunkte in der Glykolyse gelten (LOWRY und PASSONNEAU, 1964; LOWRY et al., 1964; KRIEGLSTEIN und STOCK, 1973; STRANG und BACHELARD, 1973), konnten unter der Wirkung des Antimetaboliten durch die schon erwähnte Hemmung der Glucose-6-phosphat-Isomerase besser voneinander differenziert werden (Abbildung 12). Unter diesen Bedingungen zeigte sich, daß die nach der Vorbehandlung mit 6-Aminonicotinsäureamid erhöhte cerebrale Konzentration von Glucose-6-phosphat nach der anschließenden Perfusion des Gehirns mit dem Thiopental enthaltenden Medium zwar weiterhin höher als in den Kontrollversuchen lag, jedoch im Vergleich zu den Experimenten mit dem Antimetaboliten allein sehr deutlich erniedrigt war (Abbildung 3).

Eine Aktivierung der cerebralen Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, wie sie von TAKEMORI (1965) für Narkotika diskutiert wurde, ist als Ursache der

Abbildung 12: Eingriff von 6-Aminonicotinsäureamid im Pentose-Phosphat-Weg und in der Glykolyse



relativen Konzentrationsabnahme von Glucose-6-phosphat unter Thiopental an Hand der vorliegenden Ergebnisse (kein Narkotikumeneffekt auf den 6-Phosphogluconat-Spiegel) nicht anzunehmen. Der unter der Zusammenwirkung von 6-Aminonicotinsäureamid und Thiopental beobachtete Effekt dürfte eher durch eine Hemmung der cerebralen Hexokinase in der Narkose erklärt werden. Die Frage, wie die angenommene Hemmung zustande kommt, läßt sich allerdings durch die Ergebnisse der Versuche am isoliert perfundierten Rattenhirn nicht klären; sowohl ein direkter Thiopentaleffekt als auch eine durch physiologische Substrate vermittelte Wirkung an der cerebralen Hexokinase könnte zu der Beeinträchtigung der Enzymaktivität geführt haben. Erst weitere Experimente, die unter in vivo und in vitro-Bedingungen durchgeführt wurden, sollten mehr Klarheit über den Charakter des Thiopentaleingriffes an der Hexokinase bringen.

Der Einfluß von 6-Aminonicotinsäureamid auf die Glutamatkonzentration im Gehirn wurde als ein interessanter Nebebefund der Versuche am isoliert perfundierten Rattenhirn, in ergänzenden in vivo-Experimenten, weiter verfolgt. Der erniedrigte Glutamatspiegel in Gehirnen der mit dem Antimetaboliten behandelten Ratten konnte auch unter diesen Bedingungen beobachtet werden (Tabelle 5). Gleichzeitig wurde in Experimenten in vivo eine Abnahme der γ -Aminobuttersäure-Konzentration nach einer Vorbehandlung mit 6-Aminonicotinsäureamid festgestellt (Tabelle 5). Die Aspartatkonzentration, die auch mitgemessen wurde, unterlag keinen Veränderungen unter der Einwirkung des Antimetaboliten.

Die Konzentration der beiden putativen Neurotransmitter - Glutamat und γ -Aminobuttersäure - nahm erst nach einer längeren Einwirkungszeit des Pharmakons ab (Tabelle 6). Dadurch könnte erklärt werden, weshalb in anderen Experimenten mit 6-Aminonicotinsäureamid, in denen kürzere Einwirkungszeiten festgelegt wurden, der Effekt nicht nachzuweisen war (KRIEGLSTEIN und STOCK, 1975b).

Die Konzentrationsabnahme der beiden Aminosäuren, die im Nebenschluß des Citronensäurezyklus, dem sogenannten GABA-shunt, als wichtige Metaboliten auftreten, könnte möglicherweise aus der Verlangsamung des Glucoseabbaus

in der Glykolyse nach 6-Aminonicotinsäureamid resultieren. BAXTER (1970) wies auf eine gute Korrelation zwischen der Glykolyse, dem Citronensäurezyklus und dem GABA-shunt hin.

Es wäre aber auch denkbar, daß der Effekt auf die Konzentration der putativen Neurotransmitter durch eine direkte Hemmung bestimmter Enzymschritte z.B. der cerebralen Glutamat-Dehydrogenase zustande kommt. Unter in vitro Bedingungen konnte eine kompetitive Hemmung der NADP-abhängigen Dehydrogenase durch Analoga von NADP, die nach Gabe von 6-Aminonicotinsäureamid im Gehirn entstehen, gezeigt werden (BRUNNEMANN et al., 1964; NEUBERT und COPER, 1965; KÖHLER et al., 1970).

Die Effekte auf den Glutamat- und γ -Aminobuttersäure-Spiegel im Gehirn lassen die Wirkungsweise des Antimetaboliten in einem neuen Licht erscheinen. Es ist bekannt, daß die Behandlung mit 6-Aminonicotinsäureamid zu neurologischen Ausfallerscheinungen führt, die sich zuerst in Erregungszuständen mit krampfartigen Symptomen äußern und später in eine spastische Lähmung, besonders der hinteren Extremitäten, übergehen (JOHNSON und McCOLL, 1955; STERNBERG und PHILIPS, 1958; WOLF et al., 1959).

Diese akuten neurologischen Symptome werden von strukturellen Veränderungen und einer Degeneration von Neuronen im Rückenmark und Gehirn begleitet (SCHNEIDER und COPER, 1968; HERKEN et al., 1973). Da Glutamat und γ -Aminobuttersäure eine wichtige Rolle als Neurotransmitter im Zentralnervensystem zu spielen scheinen - Glutamat als ein exzitatorischer, γ -Aminobuttersäure als ein inhibitorischer -, sind die Veränderungen ihrer Konzentration, bzw. ihres Verhältnisses zueinander möglicherweise zum Teil für diese neurotoxische Symptomatik nach 6-Aminonicotinsäureamid verantwortlich. Ein cerebrales γ -Aminobuttersäure- und Glutamat-Defizit könnte zu Störungen der normalen Neuronenfunktion führen. Es ist bekannt, daß durch eine zu niedrige intrazelluläre Konzentration der beiden Aminosäuren die Biosynthese der Membranproteine, die Osmoregulation, der Energiestoffwechsel und das pH-Gleichgewicht gestört werden (BAXTER, 1970; McILWAIN und BACHELARD, 1971). Effekte dieser Art könnten den morphologischen Veränderungen vorausgehen, die im Rückenmark und im Gehirn nach 6-Aminonicotinsäureamid beobachtet wurden.

Aus den gesamten Untersuchungen des cerebralen Energiestoffwechsels nach 6-Aminonicotinsäureamid ergeben sich zwei interessante Aspekte:

Die neurotoxischen Effekte dieses Pharmakons stehen möglicherweise in einem engeren Zusammenhang mit den Veränderungen der cerebralen Konzentration der putativen Neurotransmitter, γ -Aminobuttersäure und Glutamat. Mit dem Antimetaboliten ist ein neues biochemisches Mittel gegeben, das im GABA-shunt eingreift und deshalb als eine Modellsubstanz bei den Untersuchungen dieses Nebenschlusses des Citronensäurezyklus eingesetzt werden könnte.

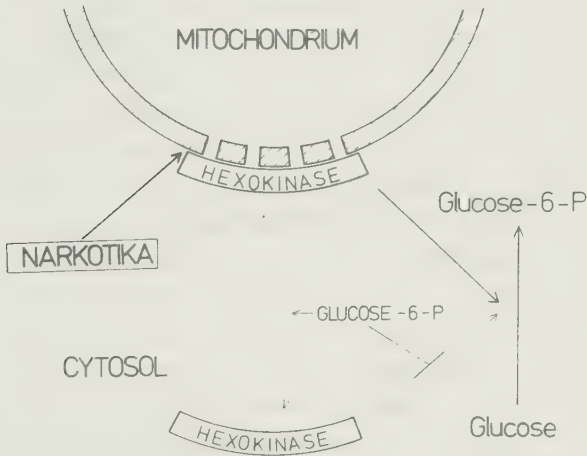
Die sich in Experimenten am isoliert perfundierten Rattenhirn in der Thiopental-Narkose andeutende Beeinträchtigung der Hexokinaseaktivität wurde weiter verfolgt. Die Prüfung eines direkten Narkotikaeffektes auf die Aktivität der Hefehexokinase wurde bereits von PORSIUS und ZWIETEN (1974) untersucht; ein inhibitorischer Pharmakaeinfluß auf die Enzymaktivität in vitro wurde nicht festgestellt. Die Relevanz dieses Befundes für die Untersuchungen der Narkotikawirkung im cerebralen Energiestoffwechsel wäre aber nur dann gegeben, wenn er auch in Experimenten an der Hirnhexokinase bestätigt werden könnte. In den in vitro durchgeführten Untersuchungen wurde deshalb zuerst der Thiopentaleinfluß auf die Aktivität der Hexokinase aus Rattenhirn geprüft. Eine direkte Hemmung der Enzymaktivität durch das Narkotikum konnte weder im Gehirnröhrenhomogenat noch in der löslichen bzw. der mitochondrialen Hexokinasefraktion in vitro nachgewiesen werden (Tabelle 7, 8). Unter in vivo-Bedingungen wurde jedoch nach Thiopental eine Verschiebung der intrazellulären Aktivitätsverteilung der Hexokinase im Gehirn beobachtet (Tabelle 9). In der Narkose nahm die weniger aktive gelöste Hexokinaseform deutlich zu. Wenn ein reversibler Austausch der cerebralen Hexokinase zwischen Mitochondrien, an die sie gebunden ist, und Cytosol einen dynamischen Regulationsprozeß der Enzymaktivität darstellt (WILSON, 1968; MOORE und JÖBSIS, 1970; HOCHMAN und SACKTOR, 1973), müßte die in der Thiopental-Narkose beobachtete Verdrängung der Hexokinase aus ihrer Bindung an Mitochondrien eine Verminderung der Gesamtaktivität des Enzyms bedeuten. Die gezeigten Verschiebungen in der cerebralen Verteilung der Hexokinase-

aktivität unter Thiopental könnten nur ein Ausdruck der in der Narkose veränderten Energiestoffwechsellaage im Gehirn sein. KNULL et al. (1973, 1974) zeigten, daß ein strenger Zusammenhang zwischen dem Energiestoffwechsel und dem Gleichgewicht der beiden Enzymformen besteht; so ist z. B. unter ischämischen Bedingungen im Gehirn, bei einem erhöhten Energiebedarf, eine rapide Konzentrationsabnahme der energiereichen Substrate wie Glucose-6-phosphat und ATP mit einem Anstieg der aktiveren mitochondrialen Hexokinase auf Kosten der gelösten Form verbunden. Es wäre vorstellbar, daß bei einem erniedrigten Energiebedarf der Zellen in der Narkose ähnliche Mechanismen für die Aktivitätsverschiebung der cerebralen Hexokinase zum gelösten Zustand verantwortlich sind. Eine Konzentrationszunahme der für die Aktivitätsverteilung der Hexokinase mitverantwortlichen Substrate wie Glucose-6-phosphat oder ATP konnte allerdings in der Narkose nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Die Verdrängung der an Mitochondrien gebundenen Hexokinase zur gelösten Enzymform hin könnte aber auch durch einen Narkotikaeingriff an der mitochondrialen Membran geschehen (Abbildung 13). Für eine direkte Thiopentalwirkung sprechen die Ergebnisse der Versuche *in vitro*; wurde die mitochondrielle Hexokinase isoliert und mit Thiopental inkubiert, war eine Zunahme der gelösten Enzymform in der Inkubationssuspension nachzuweisen (Tabelle 11). Da in dem die mitochondrielle Hexokinase enthaltenden Saccharosehomogenat ein Aufrechterhalten des Stoffwechsels auszuschließen ist (McILWAIN und BACHELARD, 1971), dürfte die Verdrängung der cerebralen Hexokinase aus ihrem mitochondrialen gebundenen Zustand durch einen direkten Thiopentaleingriff zustande kommen.

In Versuchen *in vivo* konnte eine nicht sehr ausgeprägte, jedoch statistisch signifikante Abhängigkeit des Effektes von der Thiopentaldosis gezeigt werden (Abbildung 5). Bei sehr niedrigen oder sehr hohen Narkotikumgaben werden aber die Verhältnisse unübersichtlich, da die Effekte auf die Aktivitätsverteilung der cerebralen Hexokinase zum Teil einander entgegengesetzt sein dürfen und sich aufheben könnten. Durch das Exzitationsstadium bedingter Stress bei einer niedrigen Thiopentaldosis oder hypoxische Zustände bei einer Atem-

Abbildung 13: Hypothetischer Narkotikaeingriff in die Aktivitätsverteilung der cerebralen Hexokinase



S.P. Bessmann (1975)

Glucose-6-P = Glucose-6-phosphat

lähmung nach sehr hohen Thiopentaldosen führen zu einer Beschleunigung der Glykolyse mit einer Zunahme der mitochondriellen aktiven Hexokinaseform im Gehirn. Thiopental würde dem durch die Verdrängung des Enzyms aus seiner mitochondriellen Form entgegenwirken. Eine klare Dosis-Wirkung-Beziehung wäre unter diesen Bedingungen nicht zu erwarten.

In Experimenten *in vitro* konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Verdrängungseffekt und der Thiopentaldosis gezeigt werden (Abbildung 6). Bei einer Thiopentalkonzentration von 1 mM war die Zunahme der gelösten Hexokinaseaktivität in der Inkubationssuspension sehr stark ausgeprägt, bei der Konzentration von 0,1 mM konnte sie aber auch noch gezeigt werden. Interessant ist, daß im Gehirn und im Plasma der mit Thiopental narkotisierten

Hunde eine Pharmakonkonzentration dieser Größenordnung gefunden wurde (MARK et al., 1957). Die Versuche *in vitro* entsprachen also in bezug auf die Narkotikumkonzentration den *in vivo*-Verhältnissen.

Im Zusammenhang mit der beschriebenen Thiopentalwirkung auf das Verteilungsgleichgewicht der cerebralen Hexokinaseaktivität mußte die Frage gestellt werden, wie der Effekt mit dem Narkosezustand korreliert. Ein Anhaltspunkt für die Annahme, daß die beschriebenen Veränderungen mit der Narkose verbunden sind, ist durch die Versuche *in vivo* gegeben, in denen die Aktivitätsverteilung der Hexokinase im Gehirn auch in der Aufwachphase der Narkose verfolgt wurde (Tabelle 17, Abbildung 7). In diesen Experimenten konnte eine Rückverteilung der in der tiefen Narkose zur gelösten Form hin verschobenen Hexokinaseaktivität auf die Kontrollwerte beobachtet werden. Bemerkenswert ist, daß diese Rückverteilung nicht gleichmäßig verlief. 5 Stunden nach der Thiopentalapplikation, also in der Phase, in der die Tiere gerade wach wurden, ging die gelöste Hexokinaseaktivität zurück, und zwar so, daß sich eine Abnahmetendenz auch den Kontrollwerten gegenüber andeutete (Tabelle 17, Abbildung 7). Zu diesem Zeitpunkt schien eine Verschiebung der Hexokinaseaktivität von der gelösten zur mitochondriellen Form, also umgekehrt als in der Narkose, stattzufinden. Dieser Effekt könnte vielleicht als ein Ausdruck der gesteigerten Glykolyserate in dem Aufwachstadium interpretiert werden: Da die in der Narkose angehäuften Glucose abgebaut werden mußte, wurde das Verteilungsgleichgewicht der cerebralen Hexokinase zu der aktiveren mitochondriellen Enzymform verschoben, wodurch die Phosphorylierung des Substrats beschleunigt werden konnte. 17 Stunden nach der Thiopentalapplikation waren die Tiere völlig wach, und die Verteilungsverhältnisse der cerebralen Hexokinase näherten sich denen der Kontrollversuche an. Der Verlauf der Veränderungen der Aktivitätsverteilung der cerebralen Hexokinase scheint demnach bestimmten Stadien der Narkose zu entsprechen, wobei die Zunahme der gelösten Enzymform für eine tiefe Narkose charakteristisch ist.

Einige Hinweise auf die unterschiedlichen Eingriffsmöglichkeiten von Pharmaka in das Verteilungsgleichgewicht der cerebralen Hexokinase und auf die Mechanismen, durch die die Verteilung der Hexokinaseaktivität reguliert werden

kann, lieferten Experimente, in denen Thiopental und 6-Aminonicotinsäureamid zusammen eingesetzt wurden.

Nach einer Behandlung mit dem Antimetaboliten wurde im Gehirn eine Zunahme der gelösten und eine Abnahme der mitochondriellen Hexokinaseaktivität beobachtet, ein Effekt, der sowohl qualitativ als auch quantitativ dem von Thiopental entsprach (Tabelle 12). Nach einer Inkubation der mitochondriellen Hexokinase mit 6-Aminonicotinsäureamid veränderte sich aber der Anteil der gelösten Hexokinaseaktivität in der Inkubationssuspension im Vergleich zu entsprechenden Kontrollexperimenten nicht (Tabelle 13). In den *in vitro*-Versuchen mit Thiopental nahm auch diesmal die gelöste Enzymform deutlich zu (Tabelle 13). Dieser Effekt wurde durch das mitinkubierte 6-Aminonicotinsäureamid nicht beeinflusst.

Die Befunde deuten darauf hin, daß die Effekte der beiden Substanzen auf die cerebrale Aktivitätsverteilung der Hexokinase auf unterschiedlichem Wege zustande kommen müssen. 6-Aminonicotinsäureamid führt bekanntlich zu einer Hemmung der Glucose-6-phosphat-Isomerase im Gehirn und dadurch zu einer Anhäufung von Glucose-6-phosphat (LANGE et al., 1970; KELLER et al., 1972; KRIEGLSTEIN und STOCK, 1975b). Dieses Substrat, das eine starke inhibitorische Wirkung auf die cerebrale Hexokinase ausübt, besitzt gleichzeitig die Fähigkeit, das Enzym aus seiner Bindung an Mitochondrien zu lösen (ROSE und WARMS, 1967; WILSON, 1968). Auf indirektem Wege über die Wirkung von Glucose-6-phosphat könnte es also nach 6-Aminonicotinsäureamid zu einer Zunahme der gelösten Hexokinaseaktivität im Gehirn kommen. Da sich Glucose-6-phosphat als das wirkungsvermittelnde Substrat unter *in vitro*-Bedingungen nicht anhäufen kann, blieb der Effekt auf die mitochondrielle Hexokinase aus (Tabelle 13). Folglich hatte der Antimetabolit auch keinen Einfluß auf den Thiopentaleffekt in den Experimenten *in vitro*.

Die Verhältnisse *in vivo* würden allerdings einen Einfluß von 6-Aminonicotinsäureamid auf die Narkotikumeffekte zulassen. Trotzdem war die Zunahme der gelösten und die Abnahme der mitochondriellen Hexokinaseaktivität in Versuchen, in denen die Tiere beide Substanzen bekamen, derselben Größenordnung wie nach Thiopental oder 6-Aminonicotinsäureamid allein (Tabelle 12). Mehrere entgegengerichtete Effekte auf die cerebrale Aktivitätsverteilung der

Hexokinase dürften unter der Zusammenwirkung von beiden Substanzen zustande kommen. Zu berücksichtigen wäre z. B., daß Thiopental zwar den Anteil der gelösten Hexokinase im Gehirn erhöht, aber offenbar dadurch zu einer Abnahme der nach 6-Aminonicotinsäureamid erhöhten Konzentration von Glucose-6-phosphat führt (siehe Befunde der Versuche am isoliert perfundierten Rattenhirn - Abbildung 3) und auf diese Weise den durch dieses Substrat vermittelten Antimetaboliteneffekt auf die mitochondrielle Hexokinase vermindert. Insgesamt sind die Effekte nach 6-Aminonicotinsäureamid und Thiopental in ihren Folgen zu unübersichtlich, um eine eindeutige Interpretation des Befundes zu erlauben.

Die Ergebnisse der mit Thiopental durchgeführten Untersuchungen bildeten einen neuen Ansatzpunkt für die Forschung der Narkotikawirkung auf den cerebralen Energiestoffwechsel. Eine Hemmung der Glykolyse durch die Verschiebung der Hexokinaseaktivität von der aktiven mitochondriellen zur weniger aktiven gelösten Enzymform wäre auch für andere narkotisch wirkende Pharmaka, trotz ihrer unterschiedlichen chemischen Struktur, gut vorstellbar. Diese Hypothese wurde in Experimenten mit Substanzen wie Phenobarbital, Hexobarbital, Chloralhydrat, Ketamin, Urethan, Halothan und Äther geprüft. Alle diese Narkotika führten zu einer Zunahme der gelösten Hexokinaseaktivität im Gehirn (Tabelle 14). In der Phenobarbital- und Urethan-Narkose konnte gleichzeitig eine Abnahme der mitochondriellen Hexokinaseaktivität registriert werden (Tabelle 14), eine ähnliche Tendenz zeigte sich aber auch nach allen anderen Narkotika. Die Ergebnisse der Experimente in vitro deuten darauf hin, daß die beschriebenen Effekte auf die cerebrale Hexokinase, ähnlich wie bei Thiopental, durch einen direkten Eingriff der Narkotika am mitochondriell gebundenen Enzym zustande kommen könnten. Wurde die mitochondrielle Hexokinasefraktion mit Phenobarbital, Hexobarbital, Chloralhydrat und Urethan inkubiert, war eine Aktivitätszunahme der gelösten Hexokinase in der inkubierten Suspension nachzuweisen (Tabelle 15). Ketamin bildete eine Ausnahme: dieses Pharmakon, das sich auch in seiner Wirkungsweise wesentlich von den anderen Narkotika unterscheidet, zeigte in vitro keinen Einfluß auf die mitochondrielle Hexokinase (Tabelle 15).

Wenn der direkte Narkotikaeingriff an der mitochondriellen Membran auch unter in vivo-Bedingungen stattfindet (Abbildung 13), dürfte die nach Narkotika beobachtete Hemmung der Glykolyse als ein primärer Effekt dieser Pharmaka gelten und nicht, wie bis jetzt angenommen wurde, nur eine Folge des durch die Narkose herabgesetzten Energiebedarfs im Gehirn sein.

Möglicherweise kommt aber die in der Narkose beobachtete Verschiebung der cerebralen Hexokinaseaktivität zur gelösten Enzymform hin sowohl durch eine direkte Narkotikawirkung an der mitochondriellen Membran als auch durch einen indirekten, durch physiologische Substrate vermittelten Effekt zustande. Mit dieser Hypothese ließen sich z. B. die in Experimenten mit Ketamin erhobenen Befunde gut erklären; die Verdrängung der cerebralen Hexokinase aus dem an Mitochondrien gebundenen Zustand in vivo, aber nicht in vitro ist möglicherweise auf einen indirekten Pharmakoneingriff in die intrazelluläre Enzymverteilung zurückzuführen.

Die sich in Versuchen mit Thiopental andeutende Korrelation zwischen dem Effekt auf die cerebrale Hexokinase und der Narkose konnte mit Halothan noch deutlicher demonstriert werden (Tabelle 18, Abbildung 8). Die Zunahme der gelösten Enzymform war gleichzeitig mit dem Narkoseeintritt, also schon 2 Minuten nach der Halothanapplikation, zu beobachten. Nach Beenden der 10 Minuten dauernden Narkose verschwand der Effekt, sobald der Stellreflex wieder vorhanden war.

Der Zusammenhang zwischen dem Narkosezustand und den Veränderungen in der cerebralen Verteilung der Hexokinaseaktivität nach Narkotika wurde in Experimenten, in denen eine Phenobarbital-Narkose mit Pentetrazol aufgehoben wurde, noch deutlicher (Tabelle 19, Abbildung 9). Nachdem die mit Phenobarbital narkotisierten Tiere Pentetrazol bekommen hatten und nach ca. 4 Minuten wach wurden, war auch eine Rückverteilung der in der Narkose zur gelösten Form verschobenen Hexokinaseaktivität auf die Kontrollwerte zu beobachten. Pentetrazol selbst zeigte keinen Einfluß auf die cerebrale Verteilung der Hexokinaseaktivität. Mit diesem Analeptikum konnten auch in vitro keine Effekte auf die mitochondrielle Hexokinase oder auf die Verdrängung des Enzyms aus seiner Bindung durch Phenobarbital nachgewiesen werden (Tabelle 20). Für die Umkehrung des Phenobarbitaleffektes sind möglicherweise

gewisse Veränderungen im cerebralen Energiestoffwechsel verantwortlich, die durch die Einwirkung von Pentetrazol zustande kommen.

Die Tatsache, daß sich die Veränderungen im Verteilungsgleichgewicht der cerebralen Hexokinaseaktivität nach dem Aufheben der Narkose durch die Pentetrazolgabe zurückbildeten, obwohl das Narkotikum im Gehirn noch in einer hohen Konzentration vorliegen mußte, schließt eine mögliche unspezifische, mit der Narkose selbst nicht zusammenhängende Phenobarbitalwirkung auf das Verteilungsgleichgewicht der Enzymaktivität aus.

Für die narkotische Wirkung der Pharmaka scheint ihre Lipophilie eine große Rolle zu spielen. Es konnte gezeigt werden, daß die Wirkungsstärke eines Narkotikums und seine Lipidaffinität gut miteinander korrelieren (EGER et al., 1965; 1969; SAIDMAN et al., 1967).

Barbiturate mit unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten im Wasser-Oktanoll-System wurden mit der mitochondriellen Hexokinase inkubiert, um zu prüfen, wie Verdrängung der cerebralen Hexokinase aus ihrer Bindung an Mitochondrien von der Lipophilie der Pharmaka abhängig ist.

Unter den gegebenen Bedingungen konnte jedoch keine deutliche Beziehung zwischen der Ablösung der mitochondriellen Hexokinase und der Lipophilie der Barbiturate gezeigt werden; die am stärksten lipophile Substanz - Thiopental - verursachte allerdings auch die größte Zunahme der gelösten Enzymform in der inkubierten Suspension (Tabelle 16).

Die dargestellten Ergebnisse bestätigten, daß unterschiedliche narkotisch wirksame Pharmaka die Hexokinaseaktivität vermindern können, indem sie das intrazelluläre Verteilungsgleichgewicht des Enzyms so beeinflussen, daß die gelöste weniger aktive Hexokinaseform im Gehirn zunimmt. Für die in der Narkose beobachtete Hemmung des cerebralen Glucoseabbaus könnte aber die Beeinträchtigung noch anderer die Glykolyserate regulierende Schritte, z. B. der Phosphofructokinase oder der Pyruvatkinase, mitverantwortlich sein. In einigen Experimenten in vivo und in vitro wurde der Thiopentaleinfluß auf diese Enzyme geprüft.

ABOOD et al. (1959), JOHNSON (1960), BRUNNGRABER und ABOOD (1960) zeigten, daß die cerebrale Phosphofructokinase und Pyruvatkinase fast aus-

schließlich im Cytosol vorliegen, also gerade die umgekehrten Verteilungsverhältnisse zu denen der cerebralen Hexokinase aufweisen. Die Untersuchungen an Ratten *in vivo* bestätigten das (Tabelle 21a).

Die mit Thiopental erzeugte Narkose veränderte in der schon beschriebenen Weise das Verteilungsmuster der cerebralen Hexokinaseaktivität, hatte aber auf die Aktivitätsverteilung der Phosphofructokinase und der Pyruvatkinase keinen Einfluß (Tabelle 21b). Über die Rolle der cerebralen Aktivitätsverteilung dieser beiden Enzyme gibt es in der Literatur keine einheitliche Meinung.

CRAVEN und BASFORD (1974), die eine ADP-induzierte Bindung der Phosphofructokinase an Mitochondrien nachweisen konnten, schließen eine mögliche physiologische Bedeutung der Aktivitätsverteilung des Enzyms im Gehirn nicht aus. JOHNSON (1960) meint, daß die gemessene cerebrale Aktivitätsverteilung der Phosphofructokinase, der Pyruvatkinase und der anderen glykolytischen Enzyme im Gegensatz zu der Aktivitätsverteilung der Hexokinase keine physiologische Relevanz habe und eher als ein methodischer Artefakt anzusehen sei. In dem Fall wäre ein Narkotikaeingriff ähnlicher Art wie an der cerebralen Hexokinase nicht zu erwarten.

Die *in vitro* durchgeführten Versuche mit Thiopental, in denen die Aktivität der cerebralen Pyruvatkinase geprüft wurde, zeigten, daß dieses Enzym durch das Pharmakon in seiner Wirkung nicht beeinträchtigt wird (Tabelle 22). Die cerebrale Phosphofructokinase schien jedoch einer kompetitiven Hemmung durch Thiopental zu unterliegen (Abbildungen 10, 11).

KINOSHITA et al. (1970) konnten eine ähnliche Hemmung der Phosphofructokinase durch Pentobarbital zeigen, wenngleich der Effekt sich erst mit einer sehr hohen Narkotikumkonzentration einstellte. Auch andere Autoren diskutierten schon öfters die Beeinträchtigung der Phosphofructokinaseaktivität als eine der Ursachen der Glykolysehemmung in der Narkose (LOWRY et al., 1964; BACHELARD und STRANG, 1973; DREWES und GILBOE, 1973; CARLSSON et al., 1975). An Hand der bis jetzt vorliegenden Befunde kann jedoch nicht entschieden werden, ob dieses Enzym in der Narkose tatsächlich gehemmt wird. Es ist nicht auszuschließen, daß der gezeigte Thiopentaleffekt unspezifisch ist und mit der Narkose selbst nicht zusammenhängt.

Die Ergebnisse dieser Studie über den Narkotikaeingriff in der Glykolyse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Die Verlangsamung des Glucoseabbaus im glykolytischen Fluß nach Narkotika ist möglicherweise auf die Hemmung der cerebralen Hexokinase zurückzuführen. Unterschiedliche Narkotika verschieben das intrazelluläre Hexokinasegleichgewicht im Gehirn zur gelösten weniger aktiven Enzymform hin, wobei der Effekt streng an den Narkosezustand gebunden ist. Es läßt sich nicht eindeutig entscheiden, ob die Verdrängung der cerebralen Hexokinase aus ihrer Bindung an Mitochondrien und die damit verbundene Aktivitätsbeeinträchtigung des Enzyms direkt durch einen Narkotikaeingriff an der Mitochondrienmembran zustande kommt, oder nur ein Ausdruck des in der Narkose veränderten Energiestoffwechsels ist. Möglicherweise trifft beides zu, obwohl die in vitro nach einer Inkubation mit Narkotika beobachtete Ablösung der an Mitochondrien gebundenen Hexokinase auf eine direkte, primäre Narkotikawirkung hindeuten würde.

Der Narkotikaeffekt auf die cerebrale Verteilung der Hexokinaseaktivität steht in einer guten Übereinstimmung mit den von RICHARDS (1976) für narkotisch wirksame Pharmaka angegebenen Kriterien: er ist für eine ganze Reihe chemisch unterschiedlicher Narkotika gemeinsam, zeigt eine Reversibilität, dürfte auch von der Lipophilie der Pharmaka nicht unabhängig sein und vermag die Hemmung der metabolischen Aktivität im Gehirn in der Narkose gut zu erklären. Die Hemmung der cerebralen Hexokinase über eine Verdrängung des Enzyms aus seiner aktiven mitochondriellen Form durch Narkotika (Abbildung 13) stellt eine attraktive Hypothese für ein Wirkungsprinzip dieser Pharmaka dar.

Die Rolle der Phosphofruktokinase in der Hemmung der Glykolyse nach Narkotika müßte noch genauer geklärt werden. Möglicherweise wird der Glucosefluß in der Glykolyse durch die Hemmung der beiden Schlüsselenzyme in der Narkose verlangsamt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es ist bekannt, daß Narkotika zu einer Hemmung des glykolytischen Flusses im Gehirn führen. Der Angriff dieser Pharmaka im Embden-Meyerhof-Weg wurde in dieser Arbeit näher untersucht.

Die ersten Experimente, in denen der Einfluß von Thiopental auf den cerebralen Energiestoffwechsel geprüft wurde, wurden am isoliert perfundierten Rattenhirn durchgeführt. Zur besseren Differenzierung der als potentielle Angriffspunkte der Narkotika geltenden Glykolyseschritte, der Hexokinase und der Phosphofructokinase, wurde in Versuchen mit Thiopental 6-Aminonicotinsäureamid eingesetzt, ein Antimetabolit des Nicotinamids, der im Gehirn zu einer Hemmung der Glucose-6-phosphat-Isomerase führt. Die Konzentration der folgenden Substrate und Metaboliten wurde enzymoptisch bestimmt:

Creatinphosphat, ATP, ADP, AMP, Glykogen, Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat, Pyruvat, Lactat, α -Ketoglutarat, Glutamat, Ammoniak und 6-Phosphogluconat. Stoffwechseleränderungen, die im Gehirn in der Thiopental-Narkose bzw. nach der Gabe von 6-Aminonicotinsäureamid beobachtet wurden, stimmen mit entsprechenden Befunden aus der Literatur überein.

Die Perfusion des isolierten Rattenhirns mit einem Thiopental (0,15 mM) enthaltenden Medium führte zu einer Zunahme der Creatinphosphat- und Glucosekonzentration. Die Anhäufung dieser energiereichen Substrate war von einer Abnahme des cerebralen Lactatspiegels begleitet. Nach einer Vorbehandlung der Tiere mit 6-Aminonicotinsäureamid (35 mg/kg i. p., 17 Stunden vor dem Perfusionsbeginn) konnte ein Anstieg des cerebralen 6-Phosphogluconat-, des Glucose- und des Glucose-6-phosphat-Spiegels und eine Abnahme der Lactatkonzentration beobachtet werden. Neben diesen, für den Antimetaboliten typischen Veränderungen im cerebralen Stoffwechsel wurde im isoliert perfundierten Rattenhirn nach der Vorbehandlung der Tiere mit 6-Aminonicotinsäureamid auch eine Abnahme der Glutamatkonzentration registriert.

In Versuchen, in denen 6-Aminonicotinsäureamid und Thiopental zusammen eingesetzt wurden, konnte gezeigt werden, daß die durch die Vorbehandlung mit dem Antimetaboliten (35 mg/kg i. p., 17 Stunden vor dem Perfusionsbe-

ginn) angestiegene cerebrale Konzentration von Glucose-6-phosphat nach der Perfusion des Gehirns mit dem Thiopental (0,15 mM) enthaltenden Medium zwar weiterhin hoch blieb, jedoch im Vergleich zu den Experimenten mit 6-Aminonicotinsäureamid allein sehr deutlich erniedrigt wurde. Aus dieser relativen Konzentrationsabnahme von Glucose-6-phosphat unter der Zusammenwirkung der beiden Pharmaka wurde auf eine Hemmung der cerebralen Hexokinase in der Thiopental-Narkose geschlossen.

Der Einfluß von 6-Aminonicotinsäureamid auf die Konzentration von Glutamat, eines putativen exzitatorischen Neurotransmitters im Zentralnervensystem, wurde als ein interessanter Nebentbefund der Versuche am isoliert perfundierten Rattenhirn weiter verfolgt. In ergänzenden Experimenten an Ratten in vivo wurde geprüft, ob 6-Aminonicotinsäureamid einen Einfluß auf zwei weitere putative Neurotransmitter im Gehirn, γ -Aminobuttersäure (inhibitorischer Transmitter) und Aspartat (exzitatorischer Transmitter), hat. Nach der Applikation des Antimetaboliten (35 mg/kg i. p.) wurden die folgenden Substrate und Metaboliten enzymatisch bestimmt: Creatinphosphat, ATP, ADP, AMP, Glucose, Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat, Pyruvat, Lactat, α -Ketoglutarat, Glutamat, γ -Aminobuttersäure, Aspartat, Ammoniak und 6-Phosphogluconat.

Es wurden dieselben, für 6-Aminonicotinsäureamid typischen Veränderungen im cerebralen Energiestoffwechsel gefunden, wie in den am isoliert perfundierten Rattenhirn mit dem Antimetaboliten durchgeführten Experimenten. Die Konzentrationen von 6-Phosphogluconat, Glucose und Glucose-6-phosphat waren erhöht, die Lactat- und Pyruvatkonzentrationen nahmen ab. Nach einer längeren Einwirkungszeit des Pharmakons (16 bis 30 Stunden) war im Gehirn der Spiegel von γ -Aminobuttersäure und Glutamat erniedrigt, während die cerebrale Aspartatkonzentration unverändert blieb. Es ist bekannt, daß es nach der Gabe von 6-Aminonicotinsäureamid zu erheblichen Funktionsstörungen im Zentralnervensystem kommt, die sich zuerst in Erregungszuständen mit krampfartigen Symptomen, später in spastischer Lähmung und morphologischen Veränderungen von Neuronen äußern. Es ist denkbar, daß die Veränderungen der γ -Aminobuttersäure- und Glutamatkonzentrationen im Gehirn

nach 6-Aminonicotinsäureamid mit dieser neurotoxischen Wirkungsweise des Pharmakons zusammenhängen. Die Befunde der Experimente mit dem Antimetaboliten zeigen aber auch, daß mit dieser Substanz ein neues biochemisches Mittel gegeben ist, das im sogenannten GABA-shunt (Glutamat und γ -Aminobuttersäure sind seine wichtigen Zwischenmetaboliten) eingreift. 6-Aminonicotinsäureamid stellt somit eine Modellsubstanz für Untersuchungen dieses Nebenschlusses des Citronensäurezyklus dar.

Die sich in den Experimenten am isoliert perfundierten Rattenhirn andeutende Beeinträchtigung der cerebralen Hexokinaseaktivität wurde in weiteren Untersuchungen näher geprüft.

Von verschiedenen Autoren wird postuliert, daß ein reversibler Austausch der cerebralen Hexokinase zwischen Mitochondrien, an die sie gebunden ist, und Cytosol einen dynamischen Regulationsprozeß der Enzymaktivität darstellt. Die mitochondrielle Hexokinase ist dabei als die aktivere Enzymform anzusehen. In Experimenten mit Thiopental wurde untersucht, ob die intrazelluläre Hexokinaseverteilung in Narkose beeinflußt wird. In Gehirnen der mit Thiopental behandelten Ratten konnte eine von der Thiopentaldosis abhängige Zunahme der gelösten, weniger aktiven Hexokinaseform beobachtet werden. Auch unter in vitro Bedingungen wurde nach der Inkubation der mitochondriellen Hexokinase mit dem Narkotikum eine von der Thiopentalkonzentration abhängige Zunahme der gelösten Hexokinaseaktivität in der Inkubationssuspension registriert. Der zuletzt genannte Befund spricht für einen direkten Thiopentaleffekt an der mitochondriell gebundenen Hexokinase.

Andere, chemisch zum Teil sehr unterschiedliche, narkotisch wirksame Pharmaka wie Phenobarbital (250 mg/kg i.p.), Hexobarbital (200 mg/kg i.p.), Chloralhydrat (350 mg/kg i.p.), Ketamin (150 mg/kg i.p.), Urethan (1,2 g/kg i.p.), Halothan und Äther führten ebenfalls zu einer Zunahme der gelösten Hexokinaseaktivität im Rattenhirn. Die Verdrängung der cerebralen Hexokinase aus ihrer gebundenen mitochondriellen Form konnte mit diesen Pharmaka auch unter in vitro-Bedingungen gezeigt werden. Nur Ketamin bildete eine Ausnahme. In vitro zeigte dieses Pharmakon keinen Einfluß auf die mitochondrielle Hexokinase.

In weiteren Experimenten wurde die Korrelation der Narkotikaeffekte auf die cerebrale Verteilung der Hexokinaseaktivität mit dem Narkosezustand geprüft.

Die Zunahme der gelösten Hexokinaseaktivität nach der Thiopentalapplikation war nicht mehr nachzuweisen, sobald die Tiere aus der Narkose aufwachten. In Versuchen mit Halothan wurde gezeigt, daß sich der Effekt gleichzeitig mit dem Eintreten der Narkose einstellt und mit dem Aufwachen der narkotisierten Tiere zurückbildet. Auch in Experimenten, in denen die Phenobarbital-Narkose (200 mg/kg i.p.) mit Pentetrazol (150 mg/kg i.p.) aufgehoben wurde, konnte eine Rückverteilung der in der Narkose zur gelösten Hexokinase verschobenen Enzymaktivität auf die Kontrollwerte beobachtet werden. Das Analeptikum selbst zeigte weder in vivo noch in vitro einen Einfluß auf das Verteilungsgleichgewicht der cerebralen Hexokinase.

Alle diese Befunde sprechen deutlich für eine Korrelation des Narkotikaeffektes auf die cerebrale Verteilung der Hexokinaseaktivität mit dem Narkosezustand.

In einigen Experimenten in vitro wurde weiterhin geprüft, ob die Verdrängung der cerebralen Hexokinase aus ihrer Bindung an Mitochondrien von der Lipophilie der Pharmaka abhängig ist. Barbiturate mit unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten im Wasser-Oktanol-System wurden mit der mitochondrialen Hexokinase inkubiert. Eine eindeutige Beziehung zwischen der Ablösung der mitochondrial gebundenen Hexokinase und der Lipophilie der untersuchten Pharmaka war nicht nachzuweisen, obwohl die am stärksten lipophile Substanz, Thiopental, auch die größte Zunahme der gelösten Enzymaktivität in der Inkubationssuspension verursachte.

Eine Behandlung der Versuchstiere mit 6-Aminonicotinsäureamid führte ähnlich wie eine Behandlung mit Narkotika zu einer Zunahme der gelösten Hexokinaseaktivität im Gehirn. In vitro zeigte jedoch der Antimetabolit keinen Einfluß auf die mitochondrielle Hexokinase, was auf eine indirekte Wirkung dieser Substanz auf das Verteilungsgleichgewicht der Hexokinaseaktivität in vivo schließen ließ. Die Thiopentaleffekte auf die Verteilung der Hexokinaseaktivität wurden von 6-Aminonicotinsäureamid weder in vivo noch in vitro beeinflusst.

Der Thiopentaleinfluß auf die cerebrale Phosphofructokinase und Pyruvatkinase, die neben der Hexokinase als die wichtigsten die Glykolyserate regulierenden Enzyme anzusehen sind, wurde in Experimenten in vivo und in vitro untersucht. In der Narkose blieb die cerebrale Aktivitätsverteilung der beiden Enzyme unverändert. In vitro zeigte Thiopental keinen Einfluß auf die Aktivität der cerebralen Pyruvatkinase. Die Phosphofructokinase schien jedoch unter in vitro-Bedingungen einer kompetitiven Hemmung durch das Narkotikum zu unterliegen.

Die Ergebnisse dieser Studie über den Narkotikaeingriff in der Glykolyse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Narkotika scheinen die cerebrale Hexokinase zu hemmen, indem sie das intrazelluläre Verteilungsgleichgewicht des Enzyms im Gehirn von der mitochondrialen aktiveren zur gelösten weniger aktiven Hexokinaseform verschieben. Der Effekt ist streng an den Narkosezustand gebunden. Möglicherweise ist die Verdrängung der cerebralen Hexokinase aus ihrer Bindung an Mitochondrien auf einen direkten Narkotikaeingriff an der mitochondrialen Membran zurückzuführen, obwohl nicht ausgeschlossen bleibt, daß der Effekt nur ein Ausdruck der in der Narkose veränderten Energiestoffwechsellage ist.

Die Rolle der Phosphofructokinase in der Beeinträchtigung des glykolytischen Flusses nach Narkotika muß noch genau geklärt werden. Möglicherweise sind beide Schlüsselenzyme, d. h. sowohl die Hexokinase als auch die Pyruvatkinase, an der Hemmung der Glykolyse in der Narkose beteiligt.

6. LITERATUR

- ABOOD, L. G. , BRUNNGRABER, E. G. , TAYLOR, M. : Glycolytic and oxidative phosphorylative studies with intact and disrupted rat brain mitochondria. *J. biol. Chem.* 243, 1307 (1959).
- ALDRIDGE, W. N. : Action of barbiturates upon respiratory enzymes. *Ciba Foundation Symposium: Enzymes and drug action*. S. 155, Churchill Ltd. 1962.
- ALDRIDGE, W. N. , PARKER, V. H. : Barbiturates and oxidative phosphorylation. *Biochem. J.* 76, 47 (1960).
- ANDJUS, R. H. , SUHARA, K. , SLOVITER, H. A. : An isolated, perfused rat brain preparation, its spontaneous and stimulated activity. *J. appl. Physiol.* 22, 1033 (1967).
- BAIN, J. A. : Enzymatic aspects of barbiturate action. *Fed. Proc.* 11, 653 (1952).
- BAXTER, C. F. : The nature of γ -aminobutyric acid. In: *Handbook of neurochemistry*. Vol. 3 (A. Lajtha, ed.), S. 289, New York: Plenum Press 1970.
- BERGMAYER, H. U. : *Methoden der enzymatischen Analyse*, 2. Aufl., Weinheim: Verlag Chemie 1970.
- BESSMAN, S. P. : The hexokinase acceptor theory of insulin action-hormonal control of functional compartmentation. *Life Sci.* 16, 1215 (1975).
- BIEBUYCK, J. F. , HAWKINS, R. A. : The effect of anaesthetic agents on brain tissue metabolite patterns. *Brit. J. Anaesth.* 44, 226 (1972).
- BRAND, L. , MAZZIA, V. B. D. , van POZNAK, A. , BURNS, J. J. , MARK, L. C. : Lack of correlation between electroencephalographic effects and plasma concentration of thiopentone. *Brit. J. Anaesth.* 33, 92 (1961).
- BRODIE, B. B. , BERNSTEIN, E. , MARK, L. C. : The role of body fat in limiting the duration of action of thiopental. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 105, 421 (1952).
- BRODIE, B. B. , MARK, L. C. , PAPPER, E. M. , LIEF, P. A. , BERNSTEIN, E. , ROVENSTINE, E. A. : The fate of thiopental in man and a method of its estimation in biological material. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 98, 85 (1950).

- BRODY, T. M. : The uncoupling of oxidative phosphorylation as a mechanism of drug action. *Pharmacol. Rev.* 7, 335 (1955).
- BRODY, T. M. , BAIN, J. A. : Effect of barbiturates on oxidative phosphorylation. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* 77, 50 (1951).
- BRODY, T. M. , BAIN, J. A. : Barbiturates and oxidative phosphorylation. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 110, 148 (1954).
- BRUNNEMANN, A. , COPER, H. : Pharmakologische und biochemische Eigenschaften des 6-Aminonicotinsäureamids. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* 246, 63 (1963).
- BRUNNEMANN, A. , COPER, H. , NEUBERT, D. : Biosynthese und Wirkung des 6-Aminonicotinamid-adenin dinucleotids (6-ANAD). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* 246, 437 (1964).
- BRUNNER, E. A. , PASSONNEAU, J. V. , MOLSTAD, C. : The effect of volatile anaesthetics on levels of metabolites and on metabolic rate in brain. *J. Neurochem.* 18, 2301 (1971).
- BRUNNGRABER, E. G. , ABOOD, L. G. : Mitochondrial glycolysis of rat brain and its relationship to the remainder of cellular glycolysis. *J. biol. Chem.* 235, 1847 (1960).
- BÜCHER, T. , PFLEIDERER, G. : In: *Methods in enzymology*. Vol 1, S. 435, New York, Academic Press Inc. 1955.
- CARLSSON, C. , HARP, J. R. , SJESJÖ, B. K. : Metabolic changes in the cerebral cortex of the rat reduced by intravenous pentothalsodium. *Acta anaesth. scand.* 57, 7 (1975).
- CHANCE, B. : Effects of anesthesia on metabolism and cellular functions. *Pharmacol. Rev.* 17, 183 (1965).
- CHANCE, B. , HOLLUNGER, G. : Inhibition of electron and energy transfer in mitochondria. I. Effects of amytal, thiopental, rotenone, progesterone, and methylene glycol. *J. biol. Chem.* 278, 418 (1963).
- COPER, H. , HADASS, H. , LISON, H. : Untersuchungen zum Mechanismus zentralnervöser Funktionsstörungen durch 6-Aminonicotinamid. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* 255, 97 (1966).
- COPER, H. , HERKEN, H. : Schädigung des Zentralnervensystems durch Antimetaboliten des Nicotinsäureamids. *Dtsch. med. Wschr.* 88, 2025 (1963).

- COPER, H. , NEUBERT, D. : Effect of 6-amino NAD and other NAD analogues on the formation of NADHP and its transphosphorylation to ATP. *Biochim. biophys. Acta* 82, 167 (1964).
- CRANE, R.K. , SOLS, A. : The association of hexokinase with particulate fractions of brain and other tissue homogenates. *J. biol. Chem.* 203, 273 (1953).
- CRAVEN, P.A. , BASFORD, R.E. : Brain hexokinase: immunohistochemical localization at the light microscopic level. *Biochemistry* 8, 3520 (1969).
- CRAVEN, P.A. , BASFORD, R.E. : ADP-Induced binding of phosphofructokinase to the brain mitochondrial membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 354, 49 (1974).
- CURTIS, D.R. , WATKINS, J.C. : The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. *J. Neurochem.* 6, 117 (1960).
- DEDRICK, D.F. , SCHERER, Y.D. , BIEBUYCK, J.F. : Use of a rapid brain-sampling technique in a physiologic preparation: effects of morphine, ketamine, and halothane on tissue energy intermediates. *Anesthesiology* 42, 651 (1975).
- DESCI, L. : Über die kombinierte Wirkung von Luminal-Na und Analeptika auf die Phosphatesterbildung bzw. Atmungskettenphosphorylierung von Rattenhirnhomogenaten. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* 230, 547 (1957).
- DÖRING, H.J. , OLBRISCH, R.R. : Das Verhalten der energiereichen Phosphate der Gehirnrinde bei Ausschaltung der elektrischen Aktivität durch hohe Dosen verschiedener Narkotica. *Arch. Toxikol.* 24, 83 (1968).
- DÖRING, H.J. , OLBRISCH, R.R. : Elektrocorticogramm, Bestandpotential des Gehirns und energetische Phosphatfraktionen der Hirnrinde bei Narkoticum-Überdosierung, Ischämie und Cyanidvergiftung. *Pflügers Arch.* 319, 12 (1970).
- DREWES, L.R. , GILBOE, D.D. : Glycolysis and the permeation of glucose and lactate in the isolated, perfused dog brain during anoxia and postanoxic recovery. *J. biol. Chem.* 248, 2489 (1973).
- DUFFY, T.E. , NELSON, S.R. , LOWRY, O.H. : Cerebral carbohydrate metabolism during acute hypoxia and recovery. *J. Neurochem.* 19, 959 (1972).

- EGER, E. I. , BRANDSTATER, B. , SAIDMAN, L. J. , REGAN, M. J. , SEVERINGHAUS, J. W. , MUNSON, E. S. : Equipotent alveolar concentrations of methoxyflurane, halothane, diethyl ether, fluroxene, cyclopropane, xenon and nitrous oxide in the dog. *Anesthesiology* 26, 771 (1965).
- EGER, E. I. , LUNDGREN, C. , MILLER, S. L. , STEVENS, W. C. : Anesthetic potencies of sulfur hexafluoride, carbon tetrafluoride, chloroform and ethrane in dogs: correlation with the hydrate and lipid theories of anesthetic action. *Anesthesiology* 30, 129 (1969).
- FINK, B. R. , HASCHKE, R. H. : Anaesthetic effects on cerebral metabolism. *Anesthesiology* 39, 199 (1973).
- FLEMING, M. C. , LACOURT, S. : The comperative effect of γ -hydroxybutyrate and phenobarbital on brain energy metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 14, 1905 (1965).
- FLECK, W. , KRIEGLSTEIN, J. , URBAN, W. : Zwei Apparaturen zur Perfusion des isolierten Rattenhirns. *Arzneimittel-Forsch.* 22, 1225 (1972).
- GATFIELD, P. D. , LOWRY, O. H. , SCHULZ, D. W. , PASSONNEAU, J. V. : Regional energy reserves in mouse brain and changes with ischaemia and anaesthesia. *J. Neurochem.* 13, 185 (1966).
- GEY, K. F. , RUTISHAUSER, M. , PLETSCHER, A. : Suppression of glycolysis in rat brain in vivo by chlorpromazine, reserpine, and phenobarbital. *Biochem. Pharmacol.* 14, 567 (1965).
- GOLDBERG, N. D. , PASSONNEAU, J. V. , LOWRY, O. H. : Effects of changes in brain metabolism on the level of citric acid cycle intermediates. *J. biol. Chem.* 241, 3997 (1966).
- GRAHAM, L. T. , APRISON, M. H. : Fluorometric determination of aspartate, glutamate and γ -aminobutyrate in nerve tissue using enzymic methods. *Analyt. Biochem.* 15, 487 (1966).
- GRAHAM, L. T. , SHANK, R. P. , WERMAN, R. , APRISON, M. H. : Distribution of some synaptic transmitter suspects' in cat cord: glutamic acid, aspartic acid, γ -aminobutyric acid, glycine and glutamate. *J. Neurochem.* 14, 465 (1967).
- GRANHOLM, L. , KAASIK, A. E. , NILSSON, L. , SJESJÖ, B. K. : The lactate/pyruvate ratios of cerebrospinal fluid of rats and cats related to the lactate/pyruvate, the ATP/ADP, and the phosphocreatine/creatine ratios of brain tissue. *Acta physiol. scand.* 74, 398 (1968).

- GUENTHER, W.C.: Analysis of variance. Englewood Cliffs, N.Y.: Prentice-Hall 1964.
- HANSCH, C., ANDERSON, S.M.: The structure-activity relationship in barbiturates and its similarity to that in other narcotics. *J. med. Chem.* 10, 745 (1967).
- HEIN, H., KRIEGLSTEIN, J., STOCK, R.: The effects of increased glucose supply and thiopental anesthesia on energy metabolism of the isolated perfused rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 289, 399 (1975).
- HERKEN, H.: Biosynthesis and action of dinucleotides containing 6-aminonicotinamide on membrane transport processes. *Arzneimittel-Forsch.* 18, 1235 (1968).
- HERKEN, H., KELLER, K., KOLBE, H., LANGE, K., SCHNEIDER, H.: Experimentelle Myelopathie - Biochemische Grundlagen ihrer cellulären Pathogenese. *Klin. Wschr.* 51, 644 (1973).
- HERKEN, H., LANGE, K.: Blocking of pentose phosphate pathway in the brain of rats by 6-aminonicotinamide. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. exp. Path.* 263, 496 (1969).
- HERKEN, H., LANGE, K., KOLBE, H.: Brain disorders induced by pharmacological blockade of the pentose phosphate pathway. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 36, 93 (1969).
- HERNANDEZ, A., CRANE, R.K.: Association of heart hexokinase with sub-cellular structure. *Arch. Biochem. Biophys.* 113, 223 (1966).
- HERTER, F.P., WEISSMAN, S.G., THOMPSON, H.G. Jr., HYMAN, G., MARTIN, D.S.: Clinical experience with 6-aminonicotinamide. *Cancer Res.* 21, 31 (1961).
- HOCHMAN, M.S., SACKTOR, B.: Brain mitochondrial hexokinase: solubilization by adenine nucleotides and in coupled respiration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54, 1546 (1973).
- HUNTER, F.E., LEVY, J.F., FINK, J., SCHULTZ, B., GUERRA, F., HURWITZ, A.: Studies on the mechanism by which anaerobiosis prevents swelling of mitochondria in vitro: Effect of electron transport chain inhibitors. *J. biol. Chem.* 234, 2176 (1959).
- HUSAIN, S., PARADISE, R.R.: Effect of halothane on CO₂ production from glucose, fructose and pyruvate in rat cerebral cortical slices. *J. Neurochem.* 21, 1161 (1973).

- JACOBY, W. B. : In: Methods of enzymology. Vol. 5 (S. P. Colowick and N. O. Kaplan eds.), S. 777, New York: Academic Press 1962.
- JALLING, O., LINDBERG, O., ERNSTER, L. : The effect of substituted barbiturates on mitochondrial respiration. *Act. chem. scand.* 9, 198 (1955).
- JALLING, O., LÖW, H., ERNSTER, L., LINDBERG, O. : The relation of the site of action of amytal to oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 26, 231 (1957).
- JOHNSON, M. K. : The intracellular distribution of glycolytic and other enzymes in rat-brain homogenates and mitochondrial preparations. *Biochem. J.* 77, 610 (1960).
- JOHNSON, W. J., MCCOLL, J. D. : 6-Aminonicotinamide - a potent nicotinamide antagonist. *Science* 122, 834 (1955).
- KARPATKIN, S. : Soluble and particulate hexokinase of frog skeletal muscle. *J. biol. Chem.* 242, 3525 (1967).
- KAUFFMAN, F. C., JOHNSON, E. C. : Cerebral energy reserves and glycolysis in neural tissue of 6-aminonicotinamide-treated mice. *J. Neurobiol.* 5, 379 (1974).
- KELLER, K., KOLBE, H., LANGE, K., HERKEN, H. : Behaviour of the glycolytic system of rat brain and kidney in vivo after inhibition of the glucose-phosphate isomerase, II. Substrate concentrations under the influence of ischemia, 6-aminonicotinamide and 2-deoxyglucose. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 353, 1389 (1972).
- KIERSEY, D. K., BICKFORD, R. G., FAULCONER, A., Jr. : Electro-encephalographic patterns produced by thiopental sodium during surgical operations: description and classification. *Brit. J. Anaesth.* 23, 141 (1951).
- KINOSHITA, Y., KANESHIMA, H., NAKAI, K. : Suppression of glycolysis in rat brain by pentobarbital. *Jap. J. Pharmac.* 20, 599 (1970).
- KNOLL, H. R., TAYLOR, W. F., WELLS, W. W. : Effects of energy metabolism on in vivo distribution of hexokinase in brain. *J. biol. Chem.* 218, 5414 (1973).
- KNOLL, H. R., TAYLOR, W. F., WELLS, W. W. : Insulin effects on brain energy metabolism and the related hexokinase distribution. *J. biol. Chem.*, 249, 6930 (1974).
- KÖHLER, E., BARRACH, H. J., NEUBERT, D. : Inhibition of NADP dependent oxidoreductases by the 6-aminonicotinamide analogue of NADP. *FEBS Letters* 6, 225 (1970).

- KREBS, K. H. , HENSELEIT, K.: Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 210, 33 (1932).
- KRIEGLSTEIN, G. , KRIEGLSTEIN, J. , STOCK, R.: Suitability of the isolated perfused rat brain for studying effects on cerebral metabolism. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 275, 124 (1972a).
- KRIEGLSTEIN, G. , KRIEGLSTEIN, J. , URBAN, W.: Long survival time of an isolated perfused rat brain. J. Neurochem. 19, 885 (1972b).
- KRIEGLSTEIN, J. , STOCK, R.: Comparative study of the effects of chloral hydrate and trichloroethanol on cerebral metabolism. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 277, 323 (1973).
- KRIEGLSTEIN, J. , STOCK, R.: The isolated perfused rat brain as a model for studying drugs acting on the CNS. Psychopharmacologia (Berl.) 35, 169 (1974).
- KRIEGLSTEIN, J. , STOCK, R.: Energy metabolism of the isolated perfused rat brain as influenced by anesthetics. Biochem. Pharmacol. 24, 1579 (1975a).
- KRIEGLSTEIN, J. , STOCK, R.: Decreased glycolytic flux rate in the isolated perfused rat brain after pretreatment with 6-aminonicotinamide. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 290, 323 (1975b).
- KRNJEVIĆ, K. , SCHWARTZ, S.: The action of γ aminobutyric acid on cortical neurons. Exp. Brain Res. 3, 320 (1967).
- KROPP, E. S. , WILSON, J. E.: Hexokinase binding sites on mitochondrial membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 74 (1970).
- LANGE, K. , KOLBE, H. , KELIER, K. , HERKEN, H.: Der Kohlenhydratstoffwechsel des Gehirns nach Blockade des Pentose-Phosphat-Weges durch 6-Aminonicotinsäureamid. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 351, 1241 (1970).
- LEO, A. , HANSCH, C. , ELKINS, D.: Partition coefficients and their uses. Chem. Rev. 71, 525 (1971).
- LE PAGE, G. A.: Biological energy transformations during shock as shown by tissue analysis. Amer. J. Physiol. 146, 267 (1946).
- LOWRY, O. H.: Metabolite levels as indicators of control mechanism. Fed. Proc. 25, 846 (1966).

- LOWRY, O. H. , PASSONNEAU, J. V. : The relationship between substrates and enzymes of glycolysis in brain. *J. biol. Chem.* 239, 31 (1964).
- LOWRY, O. H. , PASSONNEAU, J. V. , HASSELBERGER, F. X. , SCHULZ, D. W. : Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *J. biol. Chem.* 239, 18 (1964).
- MacMILLAN, V. , SJESJÖ, B. K. : The effect of phenobarbitone anaesthesia upon some organic phosphates, glycolytic metabolites and citric acid cycle-associated intermediates of the rat brain. *J. Neurochem.* 20, 1969 (1973).
- MARK, L. C. , BURNS, J. J. , CAMPOMANES, C. I. , NGAI, S. H. , TROUSOF, N. , PAPPER, E. M. , BRODIE, B. B. : The passage of thiopental into brain. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 119, 35 (1957).
- MAYMAN, C. I. , GATFIELD, P. D. , BRECKENRIDGE, B. McL. : The glucose content of brain in anaesthesia. *J. Neurochem.* 11, 483 (1964).
- McILWAIN, H. , BACHELARD, H. S. : Biochemistry and the central nervous system. 4th edn. Edinburgh-London: Churchill Livingstone 1971.
- MICHENFELDER, J. D. , THEYE, R. A. : In vivo toxic effects of halothane on canine cerebral metabolic pathways. *Amer. J. Physiol.* 229, 1050 (1975).
- MOORE, C. L. , JÖBSIS, F. F. : Some studies on the control of respiration in rat brain mitochondrial preparations. *Arch. Biochem. Biophys.* 138, 295 (1970).
- NELSON, S. R. , SCHULZ, D. W. , PASSONNEAU, J. V. , LOWRY, O. H. : Control of glycogen levels in brain. *J. Neurochem.* 15, 1271 (1968).
- NEUBERT, D. , COPER, H. : Die Geschwindigkeit der "malic enzyme"-Reaktion in Gegenwart von NADP-Analoga. *Biochem. Z.* 341, 485 (1965).
- NILSSON, L. , SJESJÖ, B. K. : The effect of anesthetics upon labile phosphates and upon extra- and intracellular lactate, pyruvate and bicarbonate concentrations in the rat brain. *Acta physiol. scand.* 80, 235 (1970).
- NILSSON, L. , SJESJÖ, B. K. : Influence of anesthetics on the balance between production and utilization of energy in the rat brain. *J. Neurochem.* 23, 29 (1974).
- OBATA, K. , ITO, M. , OCHI, R. , SATO, N. : Pharmacological properties of the postsynaptic inhibition of Purkinje cell axons and the action of γ -aminobutyric acid on Deiters' neurones. *Exp. Brain Res.* 4, 43 (1967).

- OBATA, K., TAKEDA, K.: Release of γ aminobutyric acid into the fourth ventricle induced by stimulation of the cat's cerebellum. *J. Neurochem.* 16, 1043 (1969).
- PASSONNEAU, J. V., BRUNNER, E. A., MOLSTAD, C., PASSONNEAU, R.: The effects of altered endocrine states and of ether anaesthesia on mouse brain. *J. Neurochem.* 18, 2317 (1971).
- PORSIUS, A. J., van ZWIETEN, P. A.: Anaesthetic agents and glycolysis. Lack of influence of anaesthetic agents on the activity of some enzymes involved in glycolysis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 284, 399 (1974).
- QUASTEL, J. H.: Respiration in the central nervous system. *Physiol. Rev.* 19, 135 (1939).
- RACKER, E.: Spectrophotometric measurement of hexokinase and phosphofructokinase activity. *J. biol. Chem.* 167, 843 (1947).
- REDETZKI, H. M., ALVAREZ-O'BOURKE, F.: 6-Aminonicotinamide, a central nervous system depressant. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 137, 173 (1962).
- RICHARDS, C. D.: Anesthetic mechanism. *Nature* 262, 534 (1976).
- ROLLESTON, F. S., NEWSHOLME, E. A.: Control of glycolysis in cerebral cortex slices. *Biochem. J.* 104, 524 (1967).
- ROSE, I. A., WARMS, J. V. B.: Mitochondrial hexokinase: release, rebinding and location. *J. biol. Chem.* 242, 1635 (1967).
- RUTISHAUSER, M.: Beeinflussung des Kohlenhydratstoffwechsels des Rattenhirns durch Psychopharmaka mit sedativer Wirkung. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmacol.* 245, 396 (1963).
- SAIDMAN, L. J., EGER, E. I., MUNSON, E. S., BABAD, A. A., MUALLEM, M.: Minimum aveolar concentrations of methoxyflurane, halothane, ether and cyclopropane in man; correlation with theories of anesthesia. *Anesthesiology* 28, 994 (1967).
- SCHMAHL, F. W., BETZ, E., TALKE, H., HOHORST, H. J.: Energiereiche Phosphate und Metabolite des Energiestoffwechsels in der Großhirnrinde der Katze. *Biochem. Z.* 342, 518 (1965).
- SCHNEIDER, H., COPER, H.: Morphologische Befunde am Zentralnervensystem der Ratte nach Vergiftung mit Antimetaboliten des Nicotinamids (6-Aminonicotinsäureamid mit 3-Acetylpyridin) und einem Cholderivat (5-Nitro-8-hydroxychinolin). *Arch. Psychiatr. Nervenkr.* 211, 138 (1968).

- SCHOLZ, R., SCHWARZ, F., BÜCHER, Th.: Barbiturate und energieliefernder Stoffwechsel in der hämoglobinfrei durchströmten Leber der Ratte. *Z. klin. Chem.* 4, 179 (1966).
- SMITH, A. L., WOLLMAN, H.: Cerebral blood flow and metabolism: Effect of anesthetic drugs and techniques. *Anesthesiology* 36, 378 (1972).
- STERNBERG, S. S., PHILIPS, F. S.: 6-Aminonicotinamide and acute degenerative changes in the central nervous system. *Science* 127, 644 (1958).
- STOCK, R.: Die Wirkung von Narkotika und tricyclischen Psychopharmaka auf den Energiestoffwechsel des isoliert perfundierten Rattenhirns. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades. Johannes Gutenberg-Universität Mainz 1973.
- STRANG, R. H. C., BACHELARD, H. S.: Rates of cerebral glucose utilization in rats anaesthetized with phenobarbitone. *J. Neurochem.* 20, 987 (1973).
- TABERNER, P. V., RICK, J. T., KERKUT, G. A.: The action of γ -hydroxybutyric acid on cerebral glucose metabolism. *J. Neurochem.* 19, 243 (1972).
- TAKEMORI, A. E.: Effect of central depressant agents on cerebral glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in rats. *J. Neurochem.* 12, 407 (1965).
- TUTTLE, J. P., WILSON, J. E.: Rat brain hexokinase: A kinetic comparison of soluble and particulate forms. *Biochim. Biophys. Acta* 212, 185 (1970).
- WEINER, N.: The content of adenine nucleotides and creatine phosphate in brain of normal and anaesthetized rats: a critical study of some factors influencing their assay. *J. Neurochem.* 7, 241 (1961).
- WILLIAMS, S., PATERSON, R. A., HEATH, H.: The effect of β , β^1 -iminodipropionitrile and anaesthesia on some adenine nucleotides of rat brain and retina. *J. Neurochem.* 15, 227 (1968).
- WILSON, J. E.: The latent hexokinase activity of rat brain mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 123 (1967).
- WILSON, J. E.: Brain hexokinase. A proposed relation between soluble-particulate distribution and activity in vivo. *J. biol. Chem.* 243, 3640 (1968).

- WILSON, W. S. : The effects of phenobarbital, leptazol, dexamphetamine, iproniazid, imipramine, LSD, chlorpromazine, reserpine and hydroxyzine on the in vivo levels of adenine nucleotides and phosphocreatine in the rat brain. Brit. J. Pharmacol. 36, 448 (1969). ,
- WOLF, A. COWEN, D. , GELLER, L. M. : The effects of an antimetabolite, 6-aminonicotinamide, on the central nervous system. Trans. Amer. neurol. Ass. 84, 140 (1959).

7. TABELLENANHANG:
EINZELERGEBNISSE

Ad Tabelle 3 und Abbildung 3: Wirkung von Thiopental und/oder 6-Aminonicotinsäureamid auf den Energiestoffwechsel des isoliert perfundierten Rattenhirns

a) Kontrollversuche

	Konzentration in $\mu\text{Mol/g}$ Gehirn (Feuchtgewicht)										
Creatinphosphat	2,79	3,65	3,47	2,85	2,27	2,31	2,50	2,61			
ATP	1,86	2,23	1,96	1,76	2,38	2,40	2,21	2,34			
ADP	0,95	0,52	0,69	0,51	0,71	0,71	0,74	0,75			
AMP	0,39	0,18	0,23	0,19	0,42	0,45	0,25	0,22			
ATP+ADP+AMP	3,20	2,93	2,88	2,46	3,51	3,56	3,20	3,31			
Glykogen	1,28	1,96	2,17	2,27	2,45	2,29	1,34	2,13			
Glucose	1,15	1,60	0,80	1,24	1,50	1,30	1,57	1,46			
Glucose-6-phosphat	0,051	0,073	0,046	0,062	0,069	0,079	0,044	0,066			
Fructose-6-phosphat	0,018	0,019	0,012	0,014	0,022	0,023	0,010	0,015			
Lactat	7,12	4,02	4,23	4,32	4,59	5,81	5,50	4,85			
Pyruvat	0,24	0,15	0,19	0,18	0,20	0,25	0,30	0,24			
Lactat/Pyruvat	30,20	26,60	22,38	24,26	22,95	23,15	18,64	20,30			
α -Ketoglutarat	0,077	0,074	0,087	0,054	0,107	0,105	0,109	0,116			
Glutamat	14,31	10,72	8,69	12,02	11,24	10,60	10,65	13,85			
Ammoniak	0,43	0,40	0,23	0,64	0,80	0,74	0,50	0,38			

Fortsetzung der Tabelle auf Seite 111

b) Thiopentalversuche

	Konzentration in $\mu\text{Mol/g}$ Gehirn (Feuchtgewicht)									
	3,40	3,20	4,20	3,28	3,78	3,98	3,47			
Creatinphosphat	2,31	1,82	2,71	2,34	2,76	2,81	2,48			
ATP	0,80	0,54	0,65	0,63	0,54	0,54	0,67			
ADP	0,28	0,15	0,19	0,18	0,20	0,19	0,22			
AMP	3,29	2,51	3,55	3,15	3,50	3,54	3,37			
ATP+ADP+AMP	4,43	2,42	2,00	2,05	1,60	2,04	2,10			
Glykogen	2,70	3,34	2,40	2,10	2,09	2,38	2,29			
Glucose	0,052	0,065	0,091	0,072	0,075	0,089	0,077			
Glucose-6-phosphat	0,020	0,013	0,018	0,010	0,017	0,022	0,020			
Fructose-6-phosphat	2,46	2,93	3,78	3,37	1,15	3,11	5,40			
Lactat	0,09	0,16	0,14	0,19	0,09	0,14	0,24			
Pyruvat	26,70	18,54	27,79	17,25	17,76	23,04	22,20			
Lactat/Pyruvat	0,089	0,131	0,095	0,071	0,055	0,051	0,083			
α -Ketoglutarat	10,53	9,98	10,44	10,30	9,60	10,51	10,90			
Glutamat	0,39	0,52	0,23	0,46	0,41	0,35	0,66			
Ammoniak										

Fortsetzung der Tabelle auf Seite 112

c) 6-AN-Versuche

Konzentration in $\mu\text{Mol/g}$ Gehirn (Feuchtgewicht)

Creatinphosphat	2,34	3,07	2,59	2,97	3,58	3,88	2,45	2,70
ATP	1,58	2,07	1,65	1,78	1,81	1,86	2,00	2,18
ADP	0,63	0,54	0,65	0,62	0,81	0,66	0,65	0,54
AMP	0,22	0,15	0,22	0,23	0,28	0,24	0,19	0,15
ATP+ADP+AMP	2,43	2,76	2,52	2,63	2,90	2,76	2,84	2,87
Glykogen	1,83	1,62	1,13	0,74	1,03	1,71	1,82	1,46
Glucose	1,93	2,98	2,31	2,15	2,02	2,07	3,03	3,63
Glucose-6-phosphat	0,120	0,112	0,151	0,151	0,176	0,162	0,155	0,139
Fructose-6-phosphat	0,022	0,018	0,012	0,018	0,017	0,018	0,013	0,018
Lactat	3,68	1,11	2,38	3,48	3,87	2,84	3,94	3,35
Pyruvat	0,14	0,07	0,23	0,13	0,34	0,55	0,19	0,16
Lactat/Pyruvat	25,70	16,60	10,50	26,60	11,35	5,17	20,41	20,70
α -Ketoglutarat	0,090	0,054	0,096	0,071	0,064	0,078	0,090	0,041
Glutamat	7,92	6,79	7,81	9,10	8,72	9,31	9,05	9,89
Ammoniak	0,51	0,40	0,22	0,40	0,55	0,59	0,62	0,84

Fortsetzung der Tabelle auf Seite 113

d) 6-AN + Thiopental-Versuche

Konzentration in $\mu\text{Mol/g}$ Gehirn (Feuchtgewicht)

Creatinphosphat	3,37	3,42	3,46	3,64	3,79	3,13	3,37
ATP	2,33	1,83	2,19	2,12	2,15	2,13	2,15
ADP	0,64	1,31	0,74	0,63	0,52	0,38	0,60
AMP	0,20	0,22	0,21	0,22	0,14	0,15	0,24
ATP+ADP+AMP	3,17	3,36	3,14	2,97	2,81	2,66	2,99
Glykogen	2,43	2,08	2,42	2,00	1,85	2,04	2,12
Glucose	3,29	3,00	2,94	2,95	3,05	2,62	3,05
Glucose-6-phosphat	0,123	0,116	0,120	0,111	0,115	0,117	0,116
Fructose-6-phosphat	0,011	0,003	0,020	0,032	0,018	0,015	0,016
Lactat	1,50	1,23	1,79	1,01	1,40	1,84	1,98
Pyruvat	0,16	0,11	0,06	0,04	0,06	0,15	0,12
Lactat/Pyruvat	9,68	11,00	28,90	26,00	24,14	12,52	16,36
α -Ketoglutarat	0,098	0,066	0,064	0,066	0,053	0,110	0,074
Glutamat	11,76	11,65	7,59	11,53	11,65	8,09	9,25
Ammoniak	0,50	0,55	0,65	0,51	0,59	0,52	0,46

Versuchsbedingungen wie in Tabelle 3 (Seite 36) angegeben.

Ad Tabelle 4: Konzentration von 6-Phosphogluconat im isoliert perfundierten Rattenhirn nach der Applikation von 6-Aminonicotinsäureamid und/oder Thiopental

	Konzentration in $\mu\text{Mol/g}$ Gehirn (Feuchtgewicht)			
(a) Kontrollversuche	0,012	0,015	0,020	0,017
(b) Thiopentalversuche	0,015	0,020	0,017	0,010
(c) 6-AN-Versuche	2,00	2,06	2,00	2,10
(d) 6-AN + Thiopental- versuche	2,17	1,93	2,03	2,05

Versuchsbedingungen wie in Tabelle 4 (Seite 38) angegeben.

Ad Tabelle 5: Einfluß von 6-Aminonicotinsäureamid auf die Substrate und Metaboliten des Energiestoffwechsels und des GABA-shunts im Rattenhirn in vivo

a) Kontrollen													
Konzentration in $\mu\text{Mol/g}$ Gehirn (Feuchtgewicht)													
Creatinphosphat	2,95	3,35	2,85	3,25	3,02	2,92	2,93	3,03	3,16	2,47	2,78	2,89	
ATP	2,02	2,09	2,32	2,40	1,96	2,12	2,11	2,08	2,30	2,09	2,16	2,14	
ADP	0,60	0,58	0,59	0,56	0,44	0,59	0,37	0,62	0,62	0,69	0,58	0,58	
AMP	0,10	0,13	0,16	0,15	0,12	0,14	0,09	0,15	0,15	0,21	0,16	0,16	
ATP+ADP+AMP	2,72	2,80	3,07	3,11	2,52	2,85	2,57	2,85	3,07	2,99	2,90	2,88	
Glucose	1,19	1,13	1,10	1,90	1,17	1,36	1,26	1,25	1,19	0,87	1,07	1,11	
Glucose-6-phosphat	0,092	0,090	0,095	0,128	0,090	0,060	0,098	0,100	0,100	0,050	0,099	0,088	
Fructose-6-phosphat	0,025	0,014	0,019	0,030	0,020	0,021	0,018	0,020	0,034	0,017	0,029	0,020	
Pyruvat	0,100	0,126	0,110	0,099	0,135	0,088	0,080	0,072	0,070	0,099	0,110	0,110	
Lactat	2,45	1,82	3,24	1,87	2,35	2,43	1,86	1,77	1,66	2,25	2,70	3,12	
α -Ketoglutarat	0,125	0,160	0,082	0,121	0,150	0,140	0,058	0,082	0,089	0,066	0,061	0,071	
Glutamat	8,90	11,43	8,81	9,15	9,40	8,30	7,03	5,44	6,58	6,64	8,88	8,02	
γ -Aminobuttersäure	1,59	1,83	2,00	2,00	1,70	1,73	1,75	1,83	2,06	2,08	2,30	1,99	
Aspartat	2,43	2,72	2,60	2,80	2,57	2,66	2,68	2,37	2,44	2,32	2,61	2,57	
Ammoniak	0,41	0,13	0,15	0,37	0,20	0,17	0,24	0,37	0,36	0,53	0,31	0,15	
6-Phosphogluconat	0,015	0,011	0,018	0,020	0,030	0,028	0,020	0,018	0,015	0,025	0,030	0,030	

Fortsetzung der Tabelle auf Seite 116

b) 6-Aminonicotinsäureamid

Konzentration in µl/lol, g Gehirn (Feuchtgewicht)

Creatinphosphat	3,64	2,98	3,15	2,92	3,06	2,91	3,21	2,71	3,38	3,09	3,71	3,23
ATP	2,02	1,85	2,20	1,72	2,02	1,83	1,75	1,93	1,88	1,81	2,16	2,15
ADP	0,56	0,42	0,54	0,56	0,51	0,41	0,41	0,36	0,59	0,57	0,59	0,54
AMP	0,12	0,13	0,14	0,14	0,14	0,11	0,12	0,13	0,10	0,16	0,15	0,18
ATP+ADP+AMP	2,70	2,40	2,88	2,42	2,67	2,35	2,28	2,42	2,57	2,54	2,90	2,87
Glucose	3,05	3,20	2,31	2,25	2,97	2,57	2,49	2,64	2,05	3,68	2,79	2,57
Glucose-6-phosphat	0,141	0,152	0,145	0,150	0,141	0,152	0,110	0,131	0,170	0,120	0,140	0,130
Fructose-6-phosphat	0,025	0,011	0,021	0,022	0,026	0,030	0,008	0,011	0,011	0,023	0,025	0,029
Pyruvat	0,061	0,062	0,030	0,050	0,048	0,083	0,042	0,080	0,080	0,057	0,070	0,070
Lactat	0,89	1,16	1,05	1,24	1,03	0,99	0,76	1,92	1,12	1,16	1,67	1,39
α-Ketoglutarat	0,101	0,061	0,042	0,059	0,115	0,110	0,021	0,015	0,280	0,060	0,076	0,020
Glutamat	8,00	8,08	7,16	7,74	8,14	6,74	5,11	6,17	5,77	4,46	4,95	4,43
γ-Aminobuttersäure	1,65	1,60	1,17	1,51	1,27	1,65	1,20	1,47	1,38	1,18	1,23	1,38
Aspartat	2,91	2,69	2,83	2,94	2,46	2,59	2,51	2,29	2,37	2,02	2,86	2,47
Ammoniak	0,20	0,28	0,55	0,34	0,59	0,42	0,67	0,48	0,20	0,38	0,36	0,34
6-Phosphogluconat	2,25	2,36	2,08	1,75	1,96	1,88	1,59	1,46	1,57	2,63	2,52	2,48

Versuchsbedingungen wie in Tabelle 5 (Seite 41) angegeben.

Ad Tabelle 6: Effekte von 6-Aminonicotinsäureamid auf den cerebralen Stoffwechsel und ihre Abhängigkeit von der Einwirkungszeit des Antimetaboliten
Konzentration in $\mu\text{Mol/g}$ Gehirn (Feuchtgewicht)

	Kontrolle						6 Stunden nach der Applikation von 6-Aminonicotinsäureamid						30 Stunden nach der Applikation von 6-Aminonicotinsäureamid											
	2,90	2,73	3,25	3,10	2,75	3,61	2,90	2,73	3,25	3,10	2,75	3,61	2,90	2,73	3,25	3,10	2,75	3,61	2,90	2,73	3,25	3,10	2,75	3,61
Creatinphosphat	2,29	2,04	2,09	2,17	2,07	1,87	2,29	2,04	2,09	2,17	2,07	1,87	2,29	2,04	2,09	2,17	2,07	1,87	2,29	2,04	2,09	2,17	2,07	1,87
ATP	2,43	2,36	1,57	2,96	2,72	1,94	2,43	2,36	1,57	2,96	2,72	1,94	2,43	2,36	1,57	2,96	2,72	1,94	2,43	2,36	1,57	2,96	2,72	1,94
Lactat	0,083	0,093	0,084	0,101	0,088	0,098	0,083	0,093	0,084	0,101	0,088	0,098	0,083	0,093	0,084	0,101	0,088	0,098	0,083	0,093	0,084	0,101	0,088	0,098
Pyruvat	11,75	8,02	9,95	9,61	8,29	8,27	11,75	8,02	9,95	9,61	8,29	8,27	11,75	8,02	9,95	9,61	8,29	8,27	11,75	8,02	9,95	9,61	8,29	8,27
L-Glutamat	1,28	1,75	1,59	1,83	1,99	1,75	1,28	1,75	1,59	1,83	1,99	1,75	1,28	1,75	1,59	1,83	1,99	1,75	1,28	1,75	1,59	1,83	1,99	1,75
β -Aminobuttersäure	0,030	0,019	0,020	0,021	0,024	0,012	0,030	0,019	0,020	0,021	0,024	0,012	0,030	0,019	0,020	0,021	0,024	0,012	0,030	0,019	0,020	0,021	0,024	0,012
6-Phosphogluconat																								
	16 Stunden nach der Applikation von 6-Aminonicotinsäureamid						30 Stunden nach der Applikation von 6-Aminonicotinsäureamid																	
	2,90	3,11	3,03	2,74	3,16	2,58	2,90	3,11	3,03	2,74	3,16	2,58	2,90	3,11	3,03	2,74	3,16	2,58	2,90	3,11	3,03	2,74	3,16	2,58
Creatinphosphat	2,07	2,12	1,94	1,76	1,87	1,77	2,07	2,12	1,94	1,76	1,87	1,77	2,07	2,12	1,94	1,76	1,87	1,77	2,07	2,12	1,94	1,76	1,87	1,77
ATP	1,60	1,39	1,42	1,09	0,97	0,90	1,60	1,39	1,42	1,09	0,97	0,90	1,60	1,39	1,42	1,09	0,97	0,90	1,60	1,39	1,42	1,09	0,97	0,90
Lactat	0,069	0,080	0,060	0,055	0,045	0,049	0,069	0,080	0,060	0,055	0,045	0,049	0,069	0,080	0,060	0,055	0,045	0,049	0,069	0,080	0,060	0,055	0,045	0,049
Pyruvat	6,16	9,60	6,87	7,12	7,48	9,26	6,16	9,60	6,87	7,12	7,48	9,26	6,16	9,60	6,87	7,12	7,48	9,26	6,16	9,60	6,87	7,12	7,48	9,26
L-Glutamat	1,51	1,25	1,06	1,38	1,60	1,48	1,51	1,25	1,06	1,38	1,60	1,48	1,51	1,25	1,06	1,38	1,60	1,48	1,51	1,25	1,06	1,38	1,60	1,48
β -Aminobuttersäure	1,58	1,96	2,57	2,22	2,09	2,05	1,58	1,96	2,57	2,22	2,09	2,05	1,58	1,96	2,57	2,22	2,09	2,05	1,58	1,96	2,57	2,22	2,09	2,05
6-Phosphogluconat																								

Versuchsbedingungen wie in Tabelle 6 (Seite 42) angegeben.

Ad Tabelle 9: Einfluß von Thiopental auf die Verteilung der Hexokinaseaktivität zwischen der gelösten und der mitochondriellen Enzymform im Rattenhirn in vivo

	Aktivität in U/g Gehirn (Feuchtgewicht)													
	Kontrollen							Thiopental						
Rohhomogenat-Hexokinase	8,58	8,52	8,67	8,72	9,43	10,99	10,64	9,69	9,45	9,47	9,93	11,46	11,25	10,61
gelöste Hexokinase	1,93	1,96	2,31	1,66	2,21	2,15	2,17	2,96	2,97	2,99	2,76	3,25	3,14	2,73
mitochondrielle Hexokinase	6,65	6,56	6,36	7,06	7,22	8,84	8,47	6,73	6,48	6,48	7,17	8,21	8,11	7,88

Versuchsbedingungen wie in Tabelle 9 (Seite 48) angegeben.

Ad Tabelle 10 und Abbildung 5: Einfluß von verschiedenen Thiopental Dosen auf die intrazelluläre Aktivitätsverteilung der Hexokinase im Rattenhirn

Aktivität in U/g Gehirn (Feuchtgewicht)

Kontrolle I		Thiopental 20 mg/kg i. p.										
Rohhomogenat-Hexokinase	11, 10	11, 10	11, 24	11, 22	11, 26	11, 42	11, 42	11, 42	10, 77	10, 79		
gelöste Hexokinase	2, 31	2, 28	2, 36	2, 18	2, 25	2, 22	2, 25	2, 20	2, 25	2, 35		
mitochondrielle Hexokinase	8, 79	8, 82	8, 88	9, 04	9, 01	9, 20	9, 17	9, 22	8, 52	8, 44		
Kontrolle II		Thiopental 40 mg/kg i. p.										
Rohhomogenat-Hexokinase	11, 66	10, 69	9, 86	7, 40	10, 69	10, 69	9, 81	10, 45	9, 94	8, 55	10, 21	9, 94
gelöste Hexokinase	2, 42	2, 36	2, 22	1, 63	2, 32	2, 32	3, 41	3, 00	3, 00	2, 28	3, 32	3, 32
mitochondrielle Hexokinase	9, 24	8, 33	7, 64	5, 77	8, 37	8, 37	6, 40	7, 45	6, 94	6, 27	6, 89	6, 62
		Thiopental 120 mg/kg i. p.										
Rohhomogenat-Hexokinase	9, 81	11, 78	11, 78	8, 58	10, 99	11, 25	9, 81	9, 53	9, 53	8, 04	10, 53	9, 38
gelöste Hexokinase	2, 90	3, 39	2, 82	2, 19	3, 05	3, 62	4, 18	3, 22	3, 22	2, 15	2, 79	2, 25
mitochondrielle Hexokinase	6, 91	8, 39	8, 96	6, 39	7, 94	7, 63	5, 63	6, 31	6, 31	5, 89	7, 74	7, 13
		Thiopental 160 mg/kg i. p.										
Rohhomogenat-Hexokinase	11, 25	11, 50	10, 72	8, 53	10, 21	10, 21						
gelöste Hexokinase	3, 86	4, 29	3, 38	2, 09	3, 11	2, 79						
mitochondrielle Hexokinase	7, 39	7, 21	7, 34	6, 44	7, 10	7, 42						

Versuchsbedingungen wie in Tabelle 10 (Seite 49) angegeben.

Ad Tabelle 12: Einfluß von 6-Aminonicotinsäureamid und/oder Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität

	Aktivität in U/g Gehirn (Feuchtgewicht)									
	Kontrolle					Thiopental				
Rohhomogenat-Hexokinase	10,35	10,53	10,72	9,49	10,39	10,41	9,49	9,49	10,51	
gelöste Hexokinase	1,93	1,93	2,25	1,82	1,82	1,93	2,25	2,21	1,91	
mitochondrielle Hexokinase	8,42	8,60	8,47	7,67	8,57	8,48	7,24	7,28	8,60	
Rohhomogenat-Hexokinase	9,37	10,45	10,45	10,35	8,91	9,49	10,19	10,53		
gelöste Hexokinase	2,36	2,79	2,54	2,57	2,39	3,11	2,57	2,83		
mitochondrielle Hexokinase	7,01	7,66	7,91	7,78	6,52	6,38	7,62	7,70		
6-Aminonicotinsäureamid										
Rohhomogenat-Hexokinase	9,21	9,43	10,67	10,19	10,19	9,11	9,11	9,91	9,16	
gelöste Hexokinase	2,28	2,28	2,57	2,61	1,96	2,84	2,93	2,89	2,68	
mitochondrielle Hexokinase	6,93	7,15	8,10	7,58	8,23	6,27	6,18	7,02	6,48	
6-Aminonicotinsäureamid + Thiopental										
Rohhomogenat-Hexokinase	9,45	9,27	9,65	10,99	10,19	9,97	9,43	10,72	9,11	
gelöste Hexokinase	3,32	3,11	2,68	2,47	2,47	3,11	2,53	2,68	2,57	
mitochondrielle Hexokinase	6,13	6,16	6,97	8,52	7,72	6,86	6,90	8,04	6,54	

Versuchsbedingungen wie in Tabelle 12 (Seite 54) angegeben.

Ad Tabelle 14: Einfluß von Narkotika auf die intrazelluläre Aktivitätsverteilung der cerebralen Hexokinase

Aktivität in U/g Gehirn (Feuchtwegicht)												
Kontrolle			Phenobarbital 250 mg/kg i. p.									
Rohomogenat-Hexokinase	8,47	9,00	8,04	9,16	9,65	9,27	9,11	9,11	8,90	8,79	8,58	8,58
gelöste Hexokinase	2,07	2,02	2,07	2,25	1,79	1,93	2,85	2,84	2,92	2,73	2,70	2,41
mitochondrielle Hexokinase	6,40	6,98	5,97	6,91	7,86	7,34	6,26	6,27	5,98	6,06	5,88	6,17
Kontrolle												
Rohomogenat-Hexokinase	10,69	9,99	9,78	10,05	9,78	9,38	8,84	10,19	10,10			
gelöste Hexokinase	2,19	2,07	2,25	2,09	1,91	1,97	2,36	2,22	2,14			
mitochondrielle Hexokinase	8,50	7,92	7,53	7,96	7,87	7,41	6,48	7,97	7,96			
Hexobarbital 200 mg/kg i. p.												
Rohomogenat-Hexokinase	10,45	10,69	10,69	10,69	10,45	9,65	8,70	9,49				
gelöste Hexokinase	3,07	2,68	2,71	2,47	2,36	2,36	2,89	2,80				
mitochondrielle Hexokinase	7,38	8,01	7,98	8,22	8,09	7,29	5,81	6,69				

Fortsetzung der Tabelle auf Seite 122

Aktivität in U/g Gehirn (Feuchtgewicht)

Chloralhydrat 350 mg/kg i. p.

Kontrolle

Rohhomogenat-Hexokinase	9,67	8,58	9,38	9,38	9,30	9,11	8,84	7,93	10,25	9,75	9,75	9,65	8,50
gelöste Hexokinase	2,35	2,38	2,33	2,05	2,15	2,09	2,79	2,60	3,16	3,54	2,79	2,67	2,95
mitochondrielle Hexokinase	7,32	6,20	7,05	7,33	7,15	7,02	6,05	5,33	7,09	6,21	6,96	6,98	5,55

Ketamin 150 mg/kg i. p.

Kontrolle

Rohhomogenat-Hexokinase	10,72	10,05	8,92	10,91	10,19	9,99	9,57	10,05	10,72	10,93	10,93	10,19	9,83
gelöste Hexokinase	2,31	2,31	2,19	2,63	2,60	2,57	2,68	2,94	3,15	3,41	3,17	2,89	2,89
mitochondrielle Hexokinase	8,41	7,74	6,73	8,28	7,59	7,42	6,89	7,11	7,57	7,52	7,76	7,30	6,94

Kontrolle

Rohhomogenat-Hexokinase	9,65	10,19	10,80	10,72	10,72	10,72	9,91	10,05	11,33	11,20	10,99	10,99
gelöste Hexokinase	2,77	2,89	2,81	2,89	2,66	2,51	2,92	2,46	2,42	2,57	2,25	2,25
mitochondrielle Hexokinase	6,88	7,30	7,99	7,83	8,06	8,21	6,99	7,59	8,91	8,63	8,74	8,74

Urethan 1,2 g/kg i. p.

Rohhomogenat-Hexokinase	9,65	9,65	11,17	10,99	10,64	10,64	10,19	9,65	11,25	11,25	11,25	11,17
gelöste Hexokinase	3,54	3,31	3,22	3,30	3,26	3,11	3,15	3,11	3,26	3,22	3,16	3,27
mitochondrielle Hexokinase	6,11	6,34	7,95	7,69	7,38	7,53	7,04	6,54	7,99	8,03	8,09	7,09

Fortsetzung der Tabelle auf Seite 123

Aktivität in U/g Gehirn (Feuchtgewicht)

Kontrolle												
Rohhomogenat-Hexokinase	10,19	8,84	10,10	10,69	9,99	10,72	10,05	8,92				
gelöste Hexokinase	2,22	2,36	2,14	2,19	2,07	2,31	2,31	2,19				
mitochondrielle Hexokinase	7,97	6,48	7,96	8,50	7,92	8,41	7,74	6,73				
Äther												
Rohhomogenat-Hexokinase	10,72	9,91	10,46	10,69	10,19	9,99	9,57	9,78				
gelöste Hexokinase	3,22	3,06	2,74	2,47	2,47	2,79	2,93	2,79				
mitochondrielle Hexokinase	7,50	6,85	7,72	8,22	7,72	7,20	6,64	6,99				
Kontrolle												
Rohhomogenat-Hexokinase	10,23	10,28	10,72	10,99	11,04	9,54	9,38					
gelöste Hexokinase	1,88	2,04	2,04	2,25	2,12	2,48	2,47					
mitochondrielle Hexokinase	8,35	8,24	8,68	8,74	8,92	7,06	6,91					
Halothan												
Rohhomogenat-Hexokinase	10,71	10,69	10,72	11,04	11,01	9,11	9,91					
gelöste Hexokinase	3,00	3,32	2,83	2,68	2,83	2,89	2,95					
mitochondrielle Hexokinase	7,71	7,37	7,89	8,36	8,18	6,22	6,96					

Versuchsbedingungen wie in Tabelle 14 (Seite 57) angegeben.

Ad Tabelle 17 und Abbildung 7: Korrelation der Thiopentaleffekte auf die cerebrale Aktivitätsverteilung der Hexokinase mit dem Narkosezustand

Aktivität in U/g Gehirn (Feuchtgewicht)									
Kontrolle									
30 Minuten nach der Thiopentalgabe									
Rohhomogenat-Hexokinase	8,84	9,89	10,45	9,65	9,91	8,24	8,20	8,06	
gelöste Hexokinase	2,42	2,41	2,37	2,25	2,31	2,16	2,16	2,35	
mitochondrielle Hexokinase	6,42	7,48	8,08	7,40	7,60	6,08	6,04	5,71	
5 Stunden nach der Thiopentalgabe									
Rohhomogenat-Hexokinase	8,04	8,30	9,65	7,77	8,28	9,81			
gelöste Hexokinase	2,79	2,73	2,89	3,43	2,73	2,90			
mitochondrielle Hexokinase	5,25	5,57	6,76	4,34	5,55	6,91			
17 Stunden nach der Thiopentalgabe									
Rohhomogenat-Hexokinase	9,45	9,27	10,61	9,65	8,76	9,54			
gelöste Hexokinase	2,10	2,32	2,52	2,14	2,00	1,95			
mitochondrielle Hexokinase	7,35	6,95	8,09	7,51	6,76	7,59			
17 Stunden nach der Thiopentalgabe									
Rohhomogenat-Hexokinase	8,58	8,14	8,04	10,37	10,29	10,69	8,68	8,39	9,11
gelöste Hexokinase	2,25	2,50	2,50	2,26	2,57	2,57	2,25	2,58	2,25
mitochondrielle Hexokinase	6,33	5,64	5,54	8,11	7,72	8,12	6,43	5,81	6,86

Versuchsbedingungen wie in Tabelle 17 (Seite 63) angegeben.

Ad Tabelle 18 und Abbildung 8: Korrelation der Halothaneffekte auf die cerebrale Aktivitätsverteilung der Hexokinase mit dem Narkosezustand

	Aktivität in U/g Gehirn (Feuchtgewicht)									
	Kontrolle					2 Minuten Halothannarkose				
Rohhomogenat-Hexokinase	9,54	9,38	8,47	8,95	8,68	8,58	9,70	10,02	8,58	8,31
gelöste Hexokinase	2,48	2,47	1,97	1,97	1,98	2,09	2,85	2,75	2,88	2,99
mitochondrielle Hexokinase	7,06	6,91	6,50	6,98	6,70	6,49	6,85	7,27	5,70	5,32

	2 Minuten nach Beenden einer 10 Minuten dauernden Halothannarkose									
	10 Minuten Halothannarkose					2 Minuten nach Beenden einer 10 Minuten dauernden Halothannarkose				
Rohhomogenat-Hexokinase	9,11	9,91	8,47	8,52	9,65	8,14	9,65	9,00	9,45	10,99
gelöste Hexokinase	2,89	2,95	2,86	2,92	2,90	2,63	2,57	2,47	2,14	2,10
mitochondrielle Hexokinase	6,22	6,96	5,61	5,60	6,75	5,51	7,08	6,53	7,31	8,89

Versuchsbedingungen wie in Tabelle 18 (Seite 65) angegeben

Ad Tabelle 19 und Abbildung 9: Einfluß von Phenobarbital und/oder Pentetrazol auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität im Rattenhirn

	Aktivität in U/g Gehirn (Feuchtgewicht)									
	Kontrolle					Phenobarbital 200 mg/kg i. p.				
Rohhomogenat-Hexokinase	8,47	9,00	8,04	9,16	9,65	9,27	9,11	9,11	8,90	8,79
gelöste Hexokinase	2,07	2,02	2,07	2,25	1,79	1,93	2,85	2,84	2,92	2,73
mitochondrielle Hexokinase	6,40	6,98	5,97	6,91	7,86	7,34	6,26	6,27	5,98	6,06

	Pentetrazol 150 mg/kg i. p.									
	Phenobarbital 200 mg/kg i. p. + Pentetrazol 150 mg/kg i. p.					Pentetrazol 150 mg/kg i. p.				
Rohhomogenat-Hexokinase	10,34	10,34	10,21	9,59	9,33	8,36	9,11	8,92	9,38	8,66
gelöste Hexokinase	2,39	2,05	2,19	2,09	2,02	2,02	2,08	1,96	1,94	1,93
mitochondrielle Hexokinase	7,95	8,29	8,02	7,50	7,31	6,34	7,03	6,96	7,44	6,73

Versuchsbedingungen wie in Tabelle 19 (Seite 68) angegeben.

LEBENS LAUF

Am 16. Oktober 1948 wurde ich als zweites Kind der Eheleute Aleksander und Zinaida Jarymowicz in Bielsk-Podlaski (Polen) geboren. Meine Eltern zogen 1952 nach Warschau um. Hier besuchte ich die Volksschule und das Allgemeinbildende Gymnasium. Die Reifeprüfung bestand ich im Sommer 1966.

Nach erfolgreich abgelegter Aufnahmeprüfung wurde ich zum Wintersemester 1966/67 zum Lebensmittelchemiestudium an der Universität Warschau zugelassen. 1968 wanderte mein Schulfreund und jetziger Mann in die Bundesrepublik Deutschland aus. Ein Jahr später, im Sommer 1969, folgte ich ihm, und am 10. Oktober 1969 heirateten wir in Ludwigshafen/Rhein. Im Wintersemester 1970/71 konnte ich mein Studium an der Universität Frankfurt wieder aufnehmen. Die Vordiplomprüfung legte ich im Sommer 1971 in Frankfurt ab. Das Hauptexamen für Lebensmittelchemiker bestand ich ebenfalls in Frankfurt im Sommer 1973.

Im November 1973 nahm ich unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. J. Krieglstein meine Arbeit im Pharmakologischen Institut in Mainz auf. Seit April 1974 setzte ich die Arbeit in Marburg fort, wo Prof. Dr. Dr. J. Krieglstein den Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie im Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie übernahm. Im April 1975 wurde ich als Stipendiatin in die Studienstiftung des deutschen Volkes aufgenommen.

Foto-Druck Lenz - Riegelpfad/Ecke Ludwigstraße - 6300 Gießen
Telefon 0641-77449